

**Zur Bestimmung von Bitterstoffen in
Drogen und Drogenzubereitungen**

München 1964

Hannelore Held



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555224_0035

Zur Bestimmung von Bitterstoffen in Drogen und Drogen-
zubereitungen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Hannelore Held
aus
Frankfurt/Main

April 1964



ichterstatter: Professor Dr. L. H ö r h a m m e r

der mündlichen Prüfung: 24. Juni 1964

I N H A L T S Ü B E R S I C H T

	Seite
E I N L E I T U N G	1
A L L G E M E I N E R T E I L	2
A. Qualitative Analyse einiger Bitterstoffdrogen und ihrer Zubereitungsformen	2
I. Chromatographische Untersuchung offizineller Bitterstofftinkturen	2
a) Voruntersuchung durch Identifizierung charakteristischer Sekundärstoffe	3
1.) Tinctura Gentianae	6
2.) Tinctura Trifolii Fibrini	9
3.) Tinctura Centaurii	12
4.) Tinctura Pimpinellae	14
5.) Tinctura Aurantii	19
6.) Tinctura Absinthii	22
7.) Tinctura Calami	25
b) Chromatographische Analyse der charakteristischen Bitterstoffe	27
II. Chromatographische Untersuchung bitterstoffhaltiger galenischer Zubereitungsformen	33
III. Chromatographische Untersuchung bitterstoffhaltiger Genußmittel	40
B. Quantitative Analyse der Gentianaceenbitterstoffe . .	44
I. Bisherige Methoden zur quantitativen Bestimmung von Bitterstoffen	44
II. Ausarbeitung einer chemischen Bestimmungsmethode mit Hilfe von Anthron	45
III. Vergleich der auf chemischem und physiologischem Wege ermittelten Bitterstoffkonzentrationen	54
IV. Vergleichende Untersuchungen über den Bitterstoffgehalt verschiedener Enzianwurzeln	57

EXPERIMENTELLER TEIL	63
I. Herkunft der Drogen	63
II. Aufbereitung und Prüfung des Drogenmaterials	64
III. Dünnschichtchromatographie	65
IV. Versuche zur Isolierung und Anreicherung der Bitterstoffe	69
a) Isolierung von Gentiopikrin	69
b) Isolierung von Amarogentin	69
c) Anreicherung der Absinthbitterstoffe Absinthin und Anabsinthin	70
d) Anreicherung des Kalmusbitterstoffs Acorin	72
V. Hydrolysen der Bitterstoffglucoside	74
VI. Isolierung der dünn-schichtchromatographisch identifizierten Cumarinderivate	74
a) Isolierung von Scopoletin aus <i>Menyanthes trifoliata</i>	74
b) Isolierung von Umbelliferon aus <i>Artemisia absinthium</i>	76
c) Isolierung von Umbelliprenin, Umbelliferon und Scopoletin aus <i>Heracleum sphondylium</i>	77
VII. Quantitative Bestimmung von Gentianaceenbitterstoffen	80
a) Aufstellen der Eichkurven ohne vorherige chromatographische Trennung der Bitterstoffe	80
b) Aufstellen der Eichkurven nach Dünnschichtchromatographie der Bitterstoffe	82
c) Bestimmung des Bitterstoffgehalts in Pflanzenextrakten	84
VIII. Vergleichende Untersuchungen über den Bitterstoffgehalt verschiedener Enzianwurzeln	85
a) Bestimmung des Bitterstoffgehalts in Wurzeln verschiedener Enzianarten	86
b) Bestimmung des Bitterstoffgehalts nach Gefriertrocknung des Drogenmaterials	88
c) Bestimmung des Bitterstoffgehalts nach unterschiedlicher Lagerungsdauer des Drogenmaterials	90
d) Bestimmung des Bitterstoffglucosidgehalts nach unterschiedlicher Lagerungsdauer der Drogenauszüge	91
IX. Physiologische Bitterwertsbestimmung nach WASICKY	93

E I N L E I T U N G

Die Tendenz, anstelle von Drogen und ihren Zubereitungsformen isolierte Reinstoffe in der Therapie zu verwenden, beruht darauf, daß der Wirkungswert von Ganzdrogenauszügen starken Schwankungen unterworfen ist und daß geeignete Prüfungsverfahren zum Nachweis der in einem Drogenauszug enthaltenen Einzelkomponenten heute noch größtenteils fehlen. Hauptaufgabe einer pharmazeutischen Arzneimittellehre ist es daher, exakte Drogenwertbestimmungs- und -identifizierungsmethoden auszuarbeiten. Dies gilt insbesondere für die Bitterstoffdrogen. Ein Ersatz des Drogenmaterials durch Reinsubstanzen ist hier unmöglich, da es bisher noch nicht gelungen ist, Bitterstoffe, die durch Luftoxydation oder pH-Änderungen sofort zersetzt werden und infolge ihres komplizierten Molekülbaus zu Umlagerungserscheinungen neigen, in befriedigender Ausbeute zu erhalten. Geeignete Analysenverfahren zum Nachweis der Identität einzelner Bitterstoffdrogen oder zur Bestimmung des Gehalts an pharmakologisch wirksamen Bitterstoffen in Drogen gemischen sind nicht vorhanden. Zur Kennzeichnung von Bitterstoffdrogen bediente man sich bis heute in Ermangelung besserer Verfahren der vergleichenden Geschmacksbestimmung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, einen Weg zu finden, der es erlaubt, Auszüge und Zubereitungsformen einiger offizineller Bitterstoffdrogen wie *Radix Gentianae*, *Folia Trifolii Fibrini*, *Herba Centaurii*, *Radix Pimpinellae*, *Pericarpium Aurantii*, *Herba Absinthii* und *Rhizoma Calami* durch eine chromatographische Analyse zu identifizieren und den Gehalt der einzelnen bitteren Komponenten einer Droge auf chemischem Wege zu bestimmen.

A L L G E M E I N E R T E I L

A. Qualitative Analyse einiger Bitterstoffdrogen und ihrer Zubereitungsformen

I. Chromatographische Untersuchung offizineller Bitter- stofftinkturen

Über die chromatographische Analyse häufig verwendeter Bitterstoffdrogen und ihrer Zubereitungsformen wie Enzianwurzel (*Radix Gentianae*), Bitterklee (*Folia Trifolii Fibrini*), Tausendgüldenkraut (*Herba Centaurii*), Bibernelnwurzel (*Radix Pimpinellae*), Pomeranzenschalen (*Pericarpium Aurantii*), Absinth (*Herba Absinthii*) und Kalmuswurzel (*Rhizoma Calami*) liegen bisher nur vereinzelte Arbeiten vor.

Untersuchungen von KORTE¹⁾²⁾³⁾ und ŠORM⁴⁾ beschränken sich auf einen papierchromatographischen Nachweis der von ihnen isolierten Bitterstoffe Gentiopikrin und Amarogentin aus *Gentiana lutea* L. und *Centaurium umbellatum* (Gilib.) sowie Absinthin und Anabsinthin aus *Artemisia absinthium* L.. HERRMANN⁵⁾ befaßte sich mit der papierchromatographischen Identifizierung von Gerbstoffen, Hydroxyzimtsäuren und Hydroxycumarinen in Auszügen von *Mentha trifoliata* L.. Arbeiten von BAERHEIM-SVENDSEN⁶⁾, SCHERM⁷⁾ und HÖRHAMMER u. Mitarb.⁸⁾ galten der chromatographischen Analyse der Cumarinderivate in Wurzeln von

-
- 1) F.KORTE, Chem.Ber. 87, 512 (1954)
 - 2) F.KORTE, Chem.Ber. 88, 704 (1955)
 - 3) F.KORTE, Chem.Ber. 87, 1357 (1954)
 - 4) F.ŠORM, L.NOVOŤNÝ u. V.HEROUT, Collection.Czechoslov.Chem. Comm. 21, 1485 (1956)
 - 5) K.HERRMANN, Arch.Pharm. 292, 325 (1959)
 - 6) A.B.SVENDSEN, Zur Chemie norwegischer Umbelliferen, Johan Grundt Tanum Forlag, Oslo (1954), S. 42-43
 - 7) A.SCHERM, Dtsch.Apotheker-Ztg. 22, 511 (1959)
 - 8) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. B.LAY, Pharmazie 15, 645 (1960)

Pimpinella magna L. und *Pimpinella saxifraga* L., während WULFF⁹⁾ versuchte, die ätherischen Öle verschiedener Rassen von *Acorus calamus* L. dünnschichtchromatographisch zu unterscheiden.

a) Voruntersuchung durch Identifizierung charakteristischer Sekundärstoffe

Infolge ihres unterschiedlichen chemischen Charakters und der dadurch bedingten Löslichkeitsunterschiede ist es nicht möglich, sämtliche Bitterstoffe der genannten Drogen in einem einzigen Fließmittelsystem aufzutrennen und durch eine spezifische Farb-reaktion zu erfassen. Bei Vorliegen eines Kombinationspräparates erfordert daher die Identifizierung der Ausgangsdrogen anhand der charakteristischen Bitterstoffe mehrere Chromatogramme in verschiedenen Systemen und die Anwendung zahlreicher Sprühreagenzien. Dieses Identifizierungsverfahren läßt sich vereinfachen, wenn es gelingt, die Einzeldrogen durch eine orientierende Voruntersuchung auf Grund typischer Sekundärstoffe soweit festzustellen, daß sich der Nachweis der charakteristischen Bitterstoffe auf die durch diese Voruntersuchung ermittelten Ausgangsdrogen beschränken läßt.

Nach zahlreichen papier- und dünnschichtchromatographischen Trennversuchen erschien uns die dünnschichtchromatographische Auftrennung der erwähnten Drogenauszüge im System Äthylacetat gesättigt mit 10%igem Ammoniak für eine derartige orientierende Voruntersuchung geeignet. Die einzelnen Drogenauszüge lassen sich nach Betrachten unter der UV-Lampe durch typische Fluoreszenzonen charakterisieren. Diese liegen für *Tinctura Gentianae*, *Tinctura Trifolii Fibrini* und *Tinctura Centaurii*

9) H.D.WULFF u. E.STAHL, Naturwiss. 47, 114 (1960)

im unteren, für Tinctura Absinthii im mittleren und für Tinctura Calami im mittleren und oberen R_f -Bereich, während sich die Fluoreszenzzonen von Tinctura Pimpinellae und Tinctura Aurantii über die gesamte Laufstrecke verteilen (siehe Abb. 1)*).

*) Die charakteristischen Fluoreszenzbilder werden zur besseren Orientierung bei der Besprechung der Einzeldrogenauszüge noch einmal abgebildet.

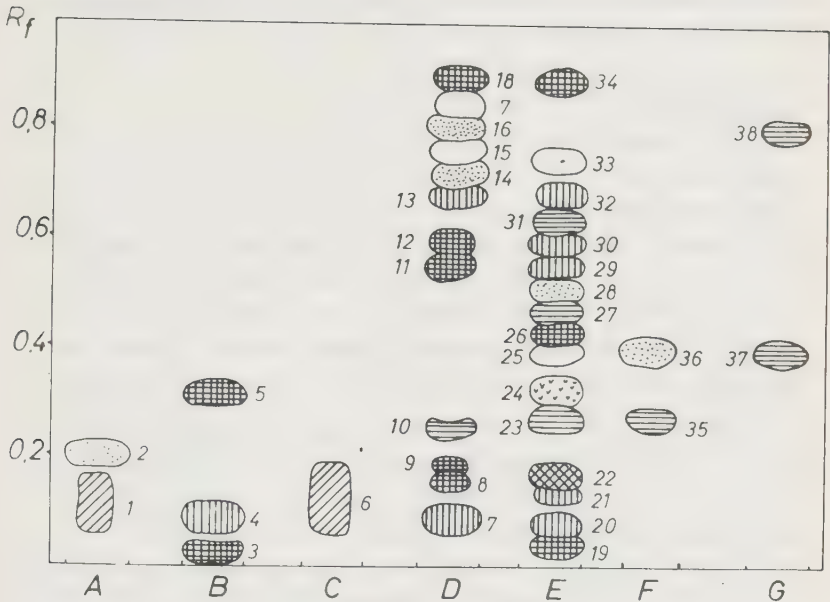


Abb. 1

UV-Fluoreszenzbilder einiger Bitterstofftinkturen nach dünn-
schichtchromatographischer Trennung im System Äthylacetat
gesättigt mit 10%igem Ammoniak

Zeichenerklärung:

 = grün	 = hellblau
 = gelb	 = violettblau
 = braun	 = blaurot
 = blau	 = gelbgrün

- A = Tinctura Gentianae (Nr. 1, 2; Erklärung s.S. 6-8)
 B = Tinctura Trifolii Fibrini (Nr. 3-5; Erklärung s.S. 9-12)
 C = Tinctura Centaurii (Nr. 6; Erklärung s.S. 13-14)
 D = Tinctura Pimpinellae (Nr. 7-18; Erklärung s.S. 14-19)
 E = Tinctura Aurantii (Nr. 19-34; Erklärung s.S. 19-22)
 F = Tinctura Absinthii (Nr. 35,36; Erklärung s.S. 22-24)
 G = Tinctura Calami (Nr. 37,38; Erklärung s.S. 25-26)

Im folgenden wurde versucht, die einzelnen Fluoreszenzzonen der Drogenauszüge charakteristischen Inhaltsstoffen zuzuordnen.

1.) Tinctura Gentianae

In Radix Gentianae konnten bisher die Bitterstoffglukoside Amarogentin¹⁰⁾ und Gentiopikrin¹¹⁾ sowie seine Hydrolyseprodukte Meso-, Eu- und Gentiogenin¹²⁾ nachgewiesen werden. Die Anwesenheit eines dritten von TANRET isolierten Bitterstoffglykosids, des Gentiamarins¹³⁾ konnte durch die Untersuchungen von KORTE¹⁴⁾ nicht bestätigt werden. Nach seinen Angaben besteht diese Verbindung aus durch Gentisin verunreinigtem Gentiopikrin.

An weiteren Inhaltsstoffen werden das Alkaloid Gentianin¹⁵⁾ und die Xanthonderivate Gentisin und Isogentisin neben dem Glykosid Gentiosid, das durch hydrolytische Spaltung in Isogentisin und Primverose zerfällt¹⁶⁾, beschrieben. Außerdem enthält die Wurzel verschiedene Zucker wie Gentianose¹⁷⁾, ihr Hydrolyseprodukt Gentiobiose¹⁸⁾ und Saccharose¹⁹⁾ sowie Gentiosterin, Pektine, Schleim²⁰⁾, Harze, Gerbstoffe, Nicotinsäure und Nicotinsäureamid²¹⁾.

Eigene Untersuchungen:

Zur chromatographischen Untersuchung verwendeten wir einen nach Vorschrift des DAB 6 mit 70%igem Äthanol bereiteten 20%igen Auszug.

10) F.KORTE, Chem.Ber. 88, 704 (1955)

11) F.KORTE, Chem.Ber. 87, 512 (1954)

12) F.KORTE, Chem.Ber. 87, 769 (1954)

13) G.TANRET, Bull.Soc.Chim. 1059 (1905)

14) F.KORTE, Chem.Ber. 87, 1357 (1954)

15) E.STEINEGGER u. H.WEIBEL, Pharm.Act.Helv. 26, 259 (1951)

16) L.CANNONICA u. F.PELLIZONI, Gazz.Chim. 85, 1007 (1955)

17) A.MEYER, Ztg.physiol.Chem. 6, 135 (1882)

18) M.BRIDEL, J.Pharm.Chim. 3, 294 (1911); ref.Chem.Abstr. 1, 1305 (1911)

19) E.BOURQUELOT, ref.C.C. 1, 1137 (1898)

20) F.BERGER, Handbuch der Drogenkunde, Wilhelm Maudrich-Verlag Wien-Bonn-Bern (1960), Bd. V., S. 215

21) H.A.HOPPE, Drogenkunde, Verlag de Gruyter u.Co., Hamburg (1958), S. 412

Tinctura Gentianae läßt sich nach chromatographischer Auftrennung in dem genannten System durch eine hellgrün und eine braun fluoreszierende Zone kennzeichnen (s. Abb. 2, 1, 2 und Abb. 1A, 1, 2 S. 5).

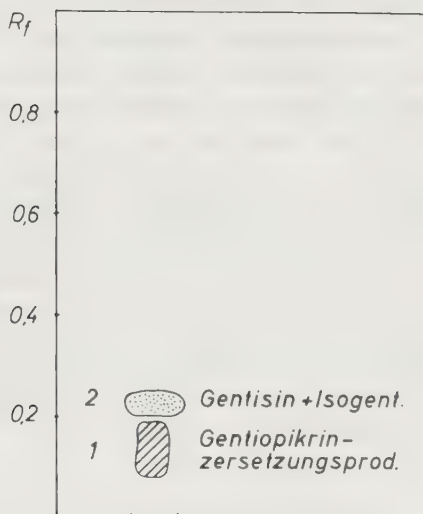


Abb. 2

UV-Fluoreszenzbild von Tinctura Gentianae nach dünnsschichtchromatographischer Auftrennung im System Äthylacetat gesättigt mit 10%igem Ammoniak

Die hellgrün fluoreszierende Zone 1 (s. Abb. 2, 1 und Abb. 1A, S. 5) entsprach in ihrem chromatographischen Verhalten authentischem G e n t i o p i k r i n (3-Glucosylhydroxy-2-oxo-6-isopropenyl-2,7 α -dihydro-6H-furano-(2,3 β)-pyran). Da diese Verbindung nur nach Chromatographie in ammoniakalischen Lösungsmittelsystemen fluo-

reszierte, dürfte ein Zersetzungsprodukt des Gentiopikrins für die auftretende Fluoreszenz verantwortlich sein. Bekanntlich wird der Lactonring im ammoniakalischen Medium unter Bildung eines Oxyssäureamids aufgespalten. Die unter der UV-Lampe braun erscheinende Zone 2 (s. Abb. 2,2 und Abb. 1A, S.5) hatte den gleichen R_F -Wert wie authentisches Gentisin (4,7-Dihydroxy-2-methoxy-xanthon) und Isogentisin (2,4-Dihydroxy-7-methoxy-xanthon). Das Verhalten beider Verbindungen gegenüber den angewandten Sprühreagenzien entsprach dem der beschriebenen Xanthonderivate. Eine Trennung der beiden Isomeren konnte erst nach Elution aus dem Chromatogramm und Papierchromatographie in dem von CANNONICA und PELLIZONI²²⁾ vorgeschlagenen System Ligroin/Butanol gesättigt mit 1.5n Ammoniumcarbonatlösung erreicht werden.

Die nachfolgende Tabelle 1 gibt einen Überblick über die chromatographischen Daten der Inhaltsstoffe, die zur Charakterisierung von Tinctura Gentianae herangezogen werden können.

T a b e l l e 1

Verbindung	R_F -Bereich in Äthyl- ac./NH ₃	Eigenfarbe		meth.KOH		Echtblausalz B		FeCl ₃	
		TL	UV	TL	UV	TL	UV	TL	UV
Gentio- pikrin- zer- setzungs- produkt	0.06-0.16	-	hell- grün	-	hell- grün	-	-	-	-
Gentisin + Isogenti- sin	0.19-0.21	-	braun	-	gelb	blaurot	-	gelbgrün	

Zeichenerklärung: TL = Tageslicht; UV = ultraviolettes Licht

22) L.CANNONICA u. F.PELLIZONI, Gazz.Chim. 85, 1007 (1955)

2. Tinctura Trifolii Fibrini

Folia Trifolii Fibrini enthalten das Bitterstoffglykosid Loganin²³⁾, sein Aglukon Loganetin²⁴⁾, das Alkaloid Gentianin²⁵⁾ und die Oxyzimtsäurederivate Chlorogen-, Isochlorogen-, Neochlorogen-, Kaffee-, Ferula- und p-Cumarsäure²⁶⁾. Die Anwesenheit von Kohlehydraten, Gerbstoffen, Pektinen, Saponinen, Harzsäuren, Palmitin-, Ameisen-, Essig- und Buttersäure als Ester des Cerylalkohols und eines noch unbekannten Phytosterins konnte durch die Untersuchungen von ZELLNER und CHAJES²⁷⁾ bestätigt werden.

Eigene Untersuchungen:

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung führten wir mit einem nach Vorschrift des DAB 6 mit 70%igem Äthanol bereiteten 20%igen Auszug durch.

Nach chromatographischer Auftrennung in dem erwähnten System läßt sich Tinctura Trifolii Fibrini durch 3 blau bzw. violettblau fluoreszierende Zonen charakterisieren (s. Abb. 33, 4, 5 und Abb. 1B, S. 5).

23) K.W.MERZ u. K.G.KREBS, Arch.Pharm. 275, 218 (1937)

24) K.W.MERZ, Arch.Pharm. 290, 543 (1957)

25) E.STEINEGGER u. H.WEIBEL, Pharm.Act.Helv. 26, 259 (1951)

26) K.HERRMANN, Arch.Pharm. 292, 325 (1959)

27) J.ZELLNER u. R.CHAJES, zit.nach F.Berger, Handbuch der Drogenkunde, Wilhelm Maudrich-Verlag, Wien (1950), Bd. II, S. 354

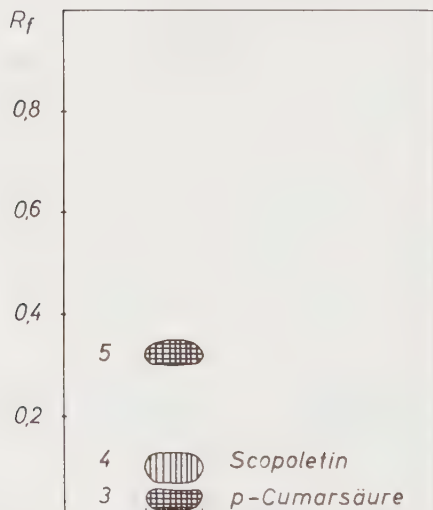


Abb. 3

UV-Fluoreszenzbild von Tinctura Trifolii Fibrini nach dünn-
schichtchromatographischer Auftrennung im System Äthylacetat
gesättigt mit 10%igem Ammoniak

Die violettblau fluoreszierende Zone 3 (s. Abb. 3,3 und Abb. 1B, S.5) dürfte auf Grund ihrer Reaktion mit Bromkresolgrün von einer organischen Säure herrühren. Reaktionen mit methanolischer Kalilauge, basischem Bleiacetat und Boraxlösung deuteten auf ein Oxyzimtsäurederivat. Durch vergleichende Dünnschichtchromatographie im System Äther/Benzol (1:1) gesättigt mit 10%iger Essigsäure²⁸⁾ konnte diese Zone der p - C u m a r - s ä u r e (p-Hydroxyzimtsäure) zugeordnet werden.

28) D.HEYDWEILLER, Dissertation München (in Vorbereitung)

Z o n e 4 (s.Abb. 3,4 und Abb. 1B, S.5) ergab mit methanolischer Kalilauge, basischem Bleiacetat und Boraxlösung eine Intensivierung der blauen Fluoreszenz. Mit Benzidin- und Diazoreagenz entstand im Tageslicht eine grau-grüne bzw. violette Verbindung. Diese Farbreaktionen wurden von FLEISCHER²⁹⁾ zur Charakterisierung des Scopoletins herangezogen. Das Vorhandensein dieses Cumarinderivates ließ sich durch vergleichende dünnschichtchromatographische Untersuchung von Belladonna- und Gelsemiumtinktur, in denen Scopoletin³⁰⁾³¹⁾ bereits nachgewiesen werden konnte, bestätigen.

Der endgültige Beweis erfolgte nach Isolierung dieser Verbindung aus einem Ätherextrakt gefriergetrockneten Blattpulvers von *Menyanthes trifoliata*. Der Extrakt wurde zunächst einer Lactontrennung nach SPÄTH³²⁾ unterworfen und die Phenolcumarinfraktion mit 50%igem Methanol an Aluminiumoxyd WOELM neutral chromatographiert. Nach Vakuumsublimation des erhaltenen Rohprodukts konnte das Sublimat durch seinen Schmelzpunkt (Smp. 204°), UV- und IR-Spektrum eindeutig als S c o p o l e t i n (7-Hydroxy-6-methoxy-cumarin) identifiziert werden.

Die violettblau fluoreszierende Z o n e 5 bei R_f 0.31 (s.Abb. 3,5 und Abb. 1B, S.5) reagierte mit keinem der angewandten Sprühreagenzien. Die Substanz verblieb nach der Lactontrennung in der Neutralfraktion. Eine Zuordnung zu bekannten Verbindungen auf Grund des chromatographischen Verhaltens war nicht möglich.

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die chromatographischen Daten des Scopoletins, das zur Charakterisierung von Tinctura Trifolii Fibrini herangezogen werden kann.

29) E.FLEISCHER, Dissertation München (Januar 1962)

30) H.PASCHKIS, Arch.Pharm. 155, 224 (1886)

31) E.SCHMIDT, Arch.Pharm. 172, 324 (1898)

32) E.SPÄTH, Chem.Ber. 70, 83 (1937)

T a b e l l e 2

Verbindung	R _f in Äthylac./ NH ₃	R _f in Äther/*) Benzol	Eigenfarbe *)TL	meth.KOH UV TL	bas.Pbac. UV TL	Echtbl.S.B UV TL
Scopoletin	0.08 - 0.10	0.30 - - 0.33	blau -	blau -	blau	blauviolett

*) Äther/Benzol (1:1) gesättigt mit 10%iger Essigsäure.

3. Tinctura Centaurii

In Herba Centaurii konnten bisher die Bitterstoffglukoside Gentiopikrin³³⁾ und Amarogentin³⁴⁾, das Alkaloid Gentianin³⁵⁾, Glukose, Fruktose, die Fettsäuren Palmitin-, Stearin-, Linolen- und Cerotinsäure frei und verestert mit Cerylalkohol und einem noch unbekannten Phytosterin³⁶⁾ ferner Oleansäure³⁷⁾, Nicotinsäure und Nicotinsäureamid³⁸⁾ nachgewiesen werden.

Eigene Untersuchungen:

Zur chromatographischen Untersuchung zogen wir einen nach Vorschrift des DAB 6 mit 70%igem Äthanol bereiteten 20%igen Auszug heran.

Tinctura Centaurii läßt nach Dünnschichtchromatographie in dem gewählten Fließmittelsystem bei R_f 0.06 - 0.16 die schon bei Enzianauszügen beschriebene und einem Zersetzungsprodukt des G e n t i o p i k r i n s zugeordnete hellgrüne Fluoreszenz (s. Abb. 4, 6 und Abb. 1C, S. 5) erkennen.

33) F.KORTE, Chem.Ber. 87, 1357 (1954)

34) F.KORTE, Chem.Ber. 88, 704 (1955)

35) E.STEINEGGER u. H.WEIBEL, Pharm.Act.Helv. 26, 259 (1951)

36) F.BERGER, Handbuch der Drogenkunde, Wilhelm Maudrich-Verlag Wien (1954), Bd.IV, S.108

37) W.PÖTHKE, A.WILHELM u. W.ARNOLD, Arch.Pharm. 283, 269 (1950)

38) B.ROLLERI, Arch.Pharm. 281, 121 (1943)

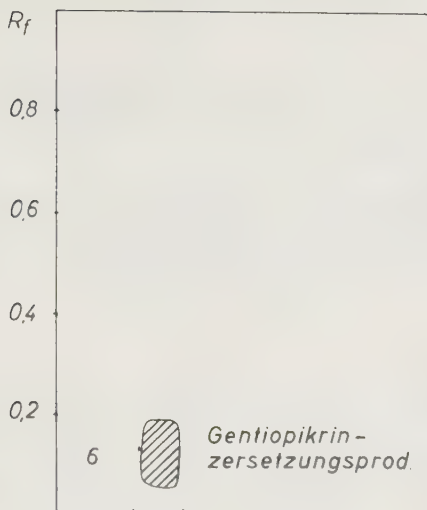


Abb. 4

UV-Fluoreszenzbild von Tinctura Centaurii nach dünnsschicht-
chromatographischer Auftrennung im System Äthylacetat ge-
sättigt mit 10%igem Ammoniak

Zur Unterscheidung der "Centauriumtinktur" von Tinctura Gentianae dient das Fehlen der beiden Xanthonderivate. Bei Vorliegen eines Kombinationspräparates, in dem neben dem Gentiopikrinzersetzungsprodukt auch die Xanthonderivate Gentisin und Isogentisin nachgewiesen werden können, muß eine gesonderte Prüfung auf Herba Centaurii durchgeführt werden. Zur Unterscheidung der beiden Gentianaceendrogen läßt sich die Oleanolsäure, die nur in Herba Centaurii vorliegt, heranziehen. Da sie wegen ihrer geringen Löslichkeit im wässrig-alkoholischen Milieu in der Tinktur nur in geringer Konzentration vorhanden ist, verwendet man zu ihrem Nachweis einen Petrolätherauszug. Oleanolsäure zersetzt sich in dem von uns zur orientierenden Vorunter-

suchung verwendeten Fließmittelsystem. Ihre Identifizierung erfolgt daher nach Dünnschichtchromatographie in den Systemen Diisopropyläther/Aceton (75:30) (R_f 0.69 - 0.71) und Äthylacetat/Methanol/Diäthylamin (70:20:15)³⁹⁾ (R_f 0.52 - 0.54) und Besprühen mit Antimon-III-chlorid bzw. Chlorsulfonsäure.

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Farbreaktionen der Oleanolsäure, die zur Charakterisierung von Tinctura Centaurii herangezogen werden kann.

T a b e l l e 3

Verbindung	Eigenfarbe		Antimon-III-chlorid		Chlorsulfonsäure	
	TL	UV	TL	UV	TL	UV
Oleanolsäure	-	-	rotviolett	rot	grüngrau	gelb

4. Tinctura Pimpinellae

Radix Pimpinellae enthält den Bitterstoff Pimpinellin⁴⁰⁾⁴¹⁾. Durch die umfangreichen Untersuchungen BAERHEIM-SVENDSEN's⁴²⁾⁴³⁾ konnte die Anwesenheit weiterer Cumarinderivate wie Isobergapten, Isopimpinellin, Sphondin, Umbelliferon, Bergapten und verschiedener Pflanzensäuren wie Aconit-, Äpfel-, Bernstein-, Fumar, Malein-, Zitronen-, Chlorogen-, China- und Kaffeesäure⁴⁴⁾ bewiesen werden. Außerdem enthalten die Wurzeln verschiedene Zucker wie Saccharose und

- 39) E.STAHL, Dünnschichtchromatographie, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962), S. 208
40) J.HERZOG u. V.HANCU, Arch.Pharm. 246, 402 (1908)
41) F.WESSELY u. E.NADLER, Monatshefte f.Chemie 60, 141 (1932)
42) A.B.SVENDSEN, Zur Chemie norwegischer Umbelliferen, Johan Grundt Tanum Forlag, Oslo (1954), S. 66
43) A.B.SVENDSEN, Pharm.Act.Helv. 44, 27 (1952)
44) A.B.SVENDSEN, Zur Chemie norwegischer Umbelliferen, Johan Grundt Tanum Forlag, Oslo (1954), S. 67

ein unbekanntes Trisaccharid neben seinen Hydrolyseprodukten sowie Sitosterol⁴⁵⁾, Saponin⁴⁶⁾ und ätherisches Öl⁴⁷⁾.

Eigene Untersuchungen:

Zur dünnschichtchromatographischen Untersuchung verwendeten wir eine nach Vorschrift des DAB 6 bereitete Tinktur. Nach dünnschichtchromatographischer Trennung läßt sich Tinctura Pimpinellae im wesentlichen durch 8 intensiv fluoreszierende Zonen (s. Abb. 5, 7, 10, 13-18 und Abb. 1D, S. 5) charakterisieren.

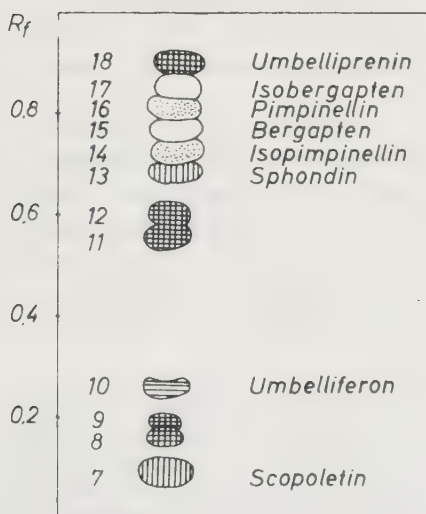


Abb. 5

UV-Fluoreszenzbild von Tinctura Pimpinellae nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung im System Äthylacetat gesättigt mit 10%igem Ammoniak

45) A.B.SVENDSEN, Zur Chemie norwegischer Umbelliferen, Johan Grundt Tanum Forlag, Oslo (1954), S. 67

46) C.VESTLIN, Pharm.Zentralh. 77, 61 (1920)

47) A.MELDOR, Dtsch.Parf.Ztg. 20, 115 (1934)

Die hellblau fluoreszierende Z o n e 7 (s.Abb. 5,7 und Abb.1D, S.5) zeigte nach der Behandlung mit methanolischer Kalilauge, basischem Bleiacetat und Boraxlösung eine Verstärkung der blauen Fluoreszenz. Mit Benzidin- und Diazo-reagenz entstand eine graugrüne bzw. violette Färbung. Der R_f -Wert dieser Zone stimmte mit der in Tinctura Trifolii Fibrini als S c o p o l e t i n identifizierten überein. Nach vergleichender Papierchromatographie im System Petroläther/Benzol/Methanol (100:5:5)⁴⁸⁾ dürfte diese Zone einer von BAERHEIM-SVENDSEN bereits als Mischsublimat erhaltenen Verbindung entsprechen, deren Reindarstellung und Identifizierung ihm aber nicht gelang.

Die nur schwach violettblau fluoreszierenden Z o n e n 8 und 9 (s.Abb.5,8,9 und Abb.1D, S.5) konnten keiner der uns bekannten Verbindungen zugeordnet werden.

Die blau fluoreszierende Z o n e 10 (s.Abb.5,10 und Abb. 1D, S.5) identifizierten wir durch ein analoges chromatographisches Verhalten mit authentischer Substanz als U m b e l l i f e r o n (7-Hydroxy-cumarin).

Die violettblau fluoreszierenden Z o n e n 11 und 12 (s.Abb.5,11,12 und Abb. 1D, S.5) entsprachen keiner der uns bekannten Verbindungen.

Die hellblau fluoreszierende Z o n e 13 (s.Abb.5,13 und Abb. 1D, S.5) verhielt sich gegenüber den angewandten Sprühreagenzien wie S p h o n d i n (6-Methoxy-7,8-furanocumarin). Die Identität konnte in einem 2. Fließmittelsystem durch R_f -Gleichheit mit authentischem Sphondin bestätigt werden.

Die hellbraun fluoreszierende Z o n e 14 (s.Abb.5,14 und Abb. 1D, S.5) färbte sich nach Behandeln mit methanolischer Kalilauge, basischem Bleiacetat und Boraxlösung bräunlich-gelb, mit Antimon-V-chlorid gelbgrün. Diese

48) A.B. SVENDSEN, Zur Chemie norwegischer Umbelliferen, Johan Grundt Tanum Forlag, Oslo (1954), S.37

Farbreaktionen sind charakteristisch für *I s o p i m - p i n e l l i n* (5,8-Dimethoxy-6,7-furanocumarin).

Die schwach gelb fluoreszierende *Z o n e 15* (s.Abb. 5, 15 und Abb. 1D, S.5) zeigte nach Behandeln mit schwachen Alkalien eine blaugüne, mit stärkeren eine blaue Fluoreszenz. Mit Antimon-V-chlorid färbte sich die Verbindung grün. Diese Farbreaktionen entsprechen authentischem *B e r g a p t e n* (5-Methoxy-6,7-furanocumarin).

Die hellbraun fluoreszierende *Z o n e 16* (s.Abb. 5, 16 und Abb. 1D, S.5) lieferte nach Behandeln mit den angewandten Sprühreagenzien die gleichen Farbreaktionen wie authentisches Pimpinellin. Durch das Übereinstimmen der R_f -Werte in verschiedenen Systemen konnte diese Zone als *P i m p i n e l l i n* (5,6-Dimethoxy-7,8-furanocumarin) identifiziert werden.

Die gelb fluoreszierende *Z o n e 17* (s.Abb. 5, 17 und Abb. 1D, S.5) entsprach in ihren Farbreaktionen mit den angewandten Sprühreagenzien dem Isobergapten. Durch übereinstimmendes chromatographisches Verhalten in verschiedenen Fließmittelsystemen konnten wir diese Zone dem *I s o b e r g a p t e n* (5-Methoxy-7,8-furanocumarin) zuordnen.

Die chromatographischen Daten der violettblau fluoreszierenden *Z o n e 18* (s.Abb. 5, 18 und Abb. 1D, S.5) entsprachen ebenfalls denen eines Cumarinderivates, obwohl über das Vorkommen weiterer Cumarinabkömmlinge in *Radix Pimpinellae* bisher keine Angaben vorliegen. Durch Übereinstimmen der chromatographischen Daten mit authentischer Testsubstanz konnte diese Zone als *U m b e l l i p r e n i n* (Farnesyläther des 7-Hydroxy-cumarins) identifiziert werden.

Tabelle 4 gibt einen Überblick über die chromatographischen Daten der Cumarinderivate, die zur Charakterisierung von *Tinctura Pimpinellae* herangezogen werden können.

T a b e l l e 4

Verbindung	R_f in Äthyl- ac./NH ₃	R_f in Äther/ Benzol		Eigenfarbe		meth.KOH		Boraxlsg.		*) diaz. Sulfan.S. TL UV
		TL	UV	TL	UV	TL	UV	TL	UV	
Umbelliprenin	0.81-0.83	-	violett	-	violett	-	violett	-	violett	orange -
Isobergapten	0.78-0.80	-	gelb	-	gelb	-	blau	-	gelbgrün	orange -
Pimpinellin	0.75-0.77	-	braun	-	braun	-	gelb	-	gelbbraun	orange -
Bergapten	0.71-0.73	-	gelb	-	gelb	-	blau	-	gelbgrün	orange -
Isopimpinellin	0.68-0.70	-	braun	-	braun	-	gelbbraun	-	gelbbraun	orange -
Sphondin	0.65-0.67	-	hellblau	-	hellblau	-	gelb	-	grün-gelb	orange -
Umbelliferon	0.28-0.30	-	blau	-	blau	-	blau	-	blau	violett -
Scopoletin	0.08-0.10	-	blau	-	blau	-	blau	-	blau	violett -

*) Die Reaktion mit diazotierter Sulfanilsäure oder Echtblausalz B eignet sich nicht zur Charakterisierung der einzelnen Cumarinderivate, da alle nichtphenolischen Cumarinabkömmlinge die gleichen Gelborangen bzw. violetten Farbtöne liefern. Die Umsetzung kann aber zur Unterscheidung der Phenolcumarine und anderer phenolischer Körper von Cumarinen herangezogen werden, da nichtphenolische α -Pyronderivate 49) erst nach Öffnung des Lactonrings im alkalischen Medium diazotiert werden.

49) W.BORSCHKE, Chem.Ber. **37**, 346 (1904)

Tinctura Pimpinellae wird bei der chromatographischen Voruntersuchung durch die Cumarinderivate Umbelliprenin, Isobergapten, Pimpinellin, Bergapten, Isopimpinellin, Sphondin, Umbelliferon und Scopoletin charakterisiert. Eine Unterscheidung zwischen Radix Pimpinellae und der als Verfälschung der Bibernellwurzel bekannten Radix Heraclei können wir auf Grund dieses Analyseverfahrens nicht treffen, da Auszüge aus Heracleum sphondylium L. ebenfalls Isobergapten, Pimpinellin, Isopimpinellin⁵⁰⁾, Bergapten und Sphondin⁵¹⁾ enthalten. Durch vergleichende Untersuchungen in den Fließmittelsystemen Äthylacetat gesättigt mit 10%igem Ammoniak, Äther/Benzol (1:1), gesättigt mit 10%iger Essigsäure und Chloroform⁵²⁾ konnten wir auch Umbelliprenin, Umbelliferon und Scopoletin in Heracleumauszügen dünnstichtchromatographisch nachweisen und nach Isolierung aus einem Ätherauszug durch Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt (Umbelliprenin Smp. 61 - 62°, Umbelliferon Smp. 228°, Scopoletin Smp. 204°), UV- und IR-Spektrum eindeutig identifizieren (s. Exp. T. S. 77-80).

5. Tinctura Aurantii

Nach den vorliegenden Literaturangaben enthält Pericarpium Aurantii das Bitterstoffglykosid Naringin⁵²⁾⁵³⁾, sein Aglykon Naringenin⁵⁴⁾, Hesperidin⁵⁵⁾, Hesperetin⁵⁶⁾, Gallussäure, ätherisches Öl⁵⁷⁾ und die Karotinoide Kryptoxanthin⁵⁸⁾, Violaxanthin⁵⁹⁾ und Citraurin⁶⁰⁾.

-
- 50) E.SPÄTH u. A.F.J.SIMON, Monatshefte f.Chemie 67, 344 (1936)
51) F.WESSELY u. F.KOTLAN, Monatshefte f.Chemie 86, 430 (1955)
52) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. B.LAY, Pharmazie 15, 645 (1960)
53) G.TANRET, C.r. 102, 518 (1886); ref.Chem.Ber. 19, 345 (1886)
54) J.RABATE, Bull.Soc.Chim.Biol. 17, 314 (1953)
55) W.WILL, Chem.Ber. 18, 1311 (1885)
56) A.HILGER, Chem.Ber. 9, 26 (1876)
57) F.BERGER, Handbuch der Drogenkunde, Wilhelm Maudrich-Verlag, Wien (1949), Bd. I, S.82
58) L.ZECHMEISTER u. P.TUZSON, Ztg.physiol.Chem. 240, 191 (1936)
59) L.ZECHMEISTER u. P.TUZSON, Chem.Ber. 69, 1878 (1936)
60) H.A.HOPPE, Drogenkunde, Verlag de Gruyter u.Co., Hamburg (1958), S. 234

Eigene Untersuchungen:

Zur dünn-schicht-chromatographischen Untersuchung verwendeten wir einen nach Vorschrift des DAB 6 mit 70%igem Äthanol bereiteten 20%igen Drogenauszug.

Nach Auftrennung in dem genannten System läßt *Tinctura Aurantii* nach Betrachten unter der UV-Lampe einen von der Startlinie bis zur Lösungsmittelfront verlaufenden Streifen intensiv fluoreszierender Zonen (s. Abb. 6, 19-34) und Abb. 1E, S.5) erkennen.

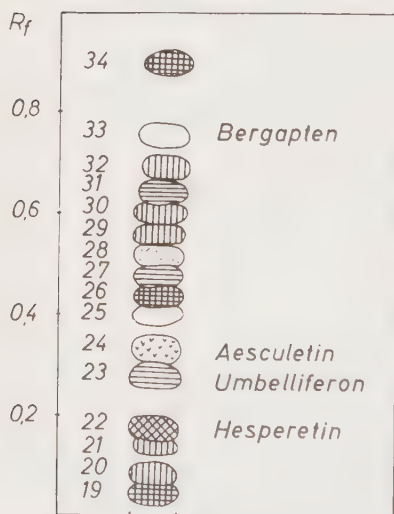


Abb. 6

UV-Fluoreszenzbild von *Tinctura Aurantii* nach dünn-schicht-chromatographischer Auftrennung im System Äthylacetat gesättigt mit 10%igem Ammoniak

Das Verhalten einiger dieser Zonen gegenüber den angewandten Sprühreagenzien deutete auf Cumarin- oder Hydroxycitronensäurederivate. BERLINGOZZI und PARRINI⁶¹⁾ war es bereits 1956 gelungen, in Citrusarten unbestimmter botani-

61) S.BERLINGOZZI u. V.PARRINI, Sperimentale Sci.chim.biol. 6, 59 (1956); ref.Chem.Abstr. 51, 4651 (1957)

scher Herkunft Cumarin, 3-Methylcumarin, Umbelliferon, 4-Methylumbelliferon, Aesculetin, Xanthotoxin, Hydroxy-peucedanin, Bergapten und Psoralen nachzuweisen.

Die Z o n e n 19, 20 und 21 (s.Abb. 6, 19-21 und Abb. 1E, S.5) konnten auf Grund ihres Verhaltens gegenüber den angewandten Sprühreagenzien keiner der uns bekannten Verbindungen zugeordnet werden.

Die gelblich-grün fluoreszierende Z o n e 22 (s.Abb.6, 22 und Abb. 1E, S.5) zeigte nach Besprühen mit Aluminiumchlorid eine grüne, mit basischem Bleiacetat eine braune und mit Magnesiumacetat eine blaugrüne Fluoreszenz. Diese Réaktionen sind charakteristisch für ein Flavanonderivat. Durch Vergleich der R_F -Werte in verschiedenen Systemen mit authentischem Hesperetin konnte diese Zone dem H e s p e r e t i n (3',5,7-Trihydroxy-4'-methoxyflavanon) zugeordnet werden. Die blau fluoreszierende Z o n e 23 (s.Abb. 6, 23 und Abb. 1E, S.5) besaß in verschiedenen Fließmittelsystemen den gleichen R_F -Wert wie die in Tinctura Pimpinellae als Umbelliferon identifizierte Zone. Ihr chromatographisches Verhalten sowie die mit den angewandten Sprühreagenzien erhaltenen Farbreaktionen entsprachen authentischem U m b e l l i f e r o n .

Die rötlich-blau fluoreszierende Z o n e 24 (s.Abb. 6, 24 und Abb. 1E, S.5) zeigte gegenüber den angewandten Sprühreagenzien das gleiche Verhalten wie authentisches A e s c u l e t i n (6,7-Dihydroxy-cumarin). Die Identität konnte durch Übereinstimmen der chromatographischen Daten in verschiedenen Fließmittelsystemen bewiesen werden.

Die Z o n e n 25 - 32 (s.Abb. 6, 25 - 32 und Abb. 1E, S.5) ließen sich nicht identifizieren.

Die gelb fluoreszierende Z o n e 33 (s.Abb. 6, 33 und Abb. 1E, S.5) besaß nach Chromatographie in verschiedenen Systemen den gleichen R_F -Wert wie die in Tinctura Pimpi-

nellae als Bergapten identifizierte Zone. Mit den angewandten Sprühreagenzien erhielten wir die gleichen Fluoreszenzänderungen.

Die violettblau fluoreszierende Zone 34 (s. Abb. 6, 34 und Abb. 1E, S.5) konnte nicht identifiziert werden.

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die chromatographischen Daten der Inhaltsstoffe, die zur Charakterisierung von Tinctura Aurantii herangezogen werden können.

T a b e l l e 5

Verbindung	R _f in Äthylacetat/ NH ₃	R _f in Äther/ Benzol	Eigenfarbe		meth.KOH		Al-chlorid		Echtbl. Salz B	
			TL	UV	TL	UV	TL	UV	TL	UV
Bergapten	0.71 - 0.73	0.78 - 0.80	-	gelb	-	blau	-	gelb	blau- rot	-
Aesculetin	0.34 - 0.36	0.41 - 0.42	-	blau	-	blau- rot	-	blau	blau- rot	-
Umbelliferon	0.28 - 0.30	0.49 - 0.51	-	blau	-	blau	-	blau	blau- rot	-
Hesperetin	0.13 - 0.15	0.54 - 0.56	-	grün- gelb	-	grün- gelb	-	grün	blau- rot	-

6. Tinctura Absinthii

Aus Herba Absinthii konnten bisher die Bitterstoffe Artabsin⁶²⁾, Absinthin und Anabsinthin⁶³⁾, das Flavonderivat Artemitin⁶⁴⁾, Gerbsäuren, Harze, Vitamin C, Vitamin B₆

62) V.HEROUT u. F.ŠORM, Chem.Listy 48, 706 (1954)

63) F.ŠORM, L.NOVOŤNY u. V.HEROUT, Collect.Czechoslov.Chem. Commun. 21, 1485 (1956)

64) Z.ČEKAN u. V.HEROUT, Chem.Listy 49, 1053 (1955)

und ätherisches Öl⁶⁵⁾ mit α,β -Thujon, Thujol⁶⁶⁾, Phellandren, Thujylalkohol, Cadinen⁶⁷⁾, Caryophyllen, Selenen, Bisabolen⁶⁸⁾, p-Cymol, d-Sabinen und Myrcen⁶⁹⁾ isoliert werden.

Eigene Untersuchungen:

Zur chromatographischen Untersuchung verwendeten wir eine nach Vorschrift des DAB 6 bereitete Tinktur. Tinctura Absinthii läßt sich an einer blauen und einer intensiv braun fluoreszierenden Zone (s. Abb. 7, 35, 36 und Abb. 1F, S. 5) erkennen.

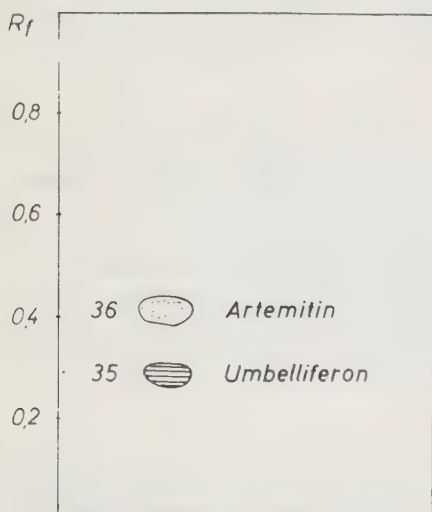


Abb. 7

UV-Fluoreszenzbild von Tinctura Absinthii nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung im System Äthylacetat gesättigt mit 10%igem Ammoniak

- 65) H.A.HOPPE, Drogenkunde, Verlag de Gruyter u.Co., Hamburg (1958), S. 102
 66) F.LEBLANC, A. 56, 357 (1845)
 67) BER.SCHIMMEL u.Co. 1, 993 (1897); zit.nach E.Gildemeister, F.Hofmann, Akademie-Verlag, Berlin (1961), Bd.VII, S. 657
 68) F.SORM u.Mitarb., Collection Czechoslov.Chem.Comm. 16, 268 (1951)
 69) F.SORM, Chem.Listy 46, 438 (1952)

Die blau fluoreszierende Z o n e 35 (s.Abb. 7, 35 und Abb. 1F, S.5) besaß den gleichen R_f -Wert wie die in Tinctura Aurantii und Pimpinellae als Umbelliferon identifizierte Zone. Ihr chromatographisches Verhalten in mehreren Fließmittelsystemen sowie die mit den angewandten Sprühreagenzien erhaltenen Farbreaktionen entsprachen authentischem Umbelliferon.

Zum Identitätsbeweis versuchten wir, diese Substanz zu isolieren. Nach Lactontrennung⁷⁰⁾ eines Ätherextrakts chromatographierten wir die Phenolcumarinfraktion mit Methanol an Aluminiumoxyd Woelm neutral. Nach Elution aus der Säule, Einengen des Lösungsmittels und Vakuumsublimation der erhaltenen Rohfraktion konnte das Sublimat durch den Mischschmelzpunkt(Smp. 228°) und das UV- und IR-Spektrum eindeutig als U m b e l l i f e r o n identifiziert werden.

Die im UV-Licht dunkelbraun erscheinende Z o n e 36 (s.Abb. 6,36 und Abb. 1F, S.5) entsprach in ihrem chromatographischen Verhalten authentischem A r t e m i t i n (5-Hydroxy-3,6,7,3',4'-pentamethoxy-flavon).

Tabelle 6 gibt einen Überblick über die chromatographischen Daten der Inhaltsstoffe, die zur Charakterisierung von Tinctura Absinthii herangezogen werden können.

T a b e l l e 6

Verbindung	R_f in Äthylacetat/ NH ₃	R_f in Äther/ Benzol	Eigenfarbe		SbCl ₃		H ₂ SO ₄		FeCl ₃	
			TL	UV	TL	UV	TL	UV	TL	UV
Artemitin	0.37 - 0.39	0.53 - 0.55	-	braun	-	gelbgrün	-	gelb	grün - braun	-
Umbelliferon	0.28 - 0.30	0.49 - 0.51	-	blau	-	blau	-	blau	grau - grün	-

70) E.SPÄTH, Chem.Ber. 70, 83 (1937)

7. Tinctura Calami

In Rhizoma Calami konnten der Bitterstoff Acorin⁷¹⁾, das Acoretin, nach THOMS⁷²⁾ ein hydrolytisches Spaltprodukt des Acorins, Cholin, seine Spaltprodukte Methyl-, Di- und Trimethylamin, ferner Palmitinsäure, Schleimstoffe, Stärke, Dextrose, Dextrin, Vitamin C und ätherisches Öl⁷³⁾ nachgewiesen werden. Die Angaben über die Bestandteile des ätherischen Öls schwanken nach Herkunftsland und Art⁷⁴⁾ der verwendeten Wurzelstöcke. Sämtlichen Ölen gemeinsam sind Asarylaldehyd⁷⁵⁾, β -Asaron⁷⁶⁾, Calameon⁷⁷⁾, α -Pinen, Camphen, Eugenol, Methyleugenol⁷⁸⁾, sowie eine Sesquiterpenfraktion, die früher als Calamen bezeichnet wurde, aber von ŠORM und Mitarbeitern⁷⁹⁾ in zahlreiche Sesquiterpene zerlegt werden konnte.

Eigene Untersuchungen:

Die chromatographische Analyse führten wir in einem nach Vorschrift des DAB 6 mit 70%igem Äthanol bereiteten 20%igen Auszug durch.

Nach dünnenschichtchromatographischer Auftrennung läßt sich Tinctura Calami an zwei blau fluoreszierenden Zonen (s. Abb. 8, 37, 38 und Abb. 1G, S. 5) erkennen.

-
- 71) H. THOMS, Arch. Pharm. 224, 465 (1886)
 - 72) H. THOMS, zit. nach Berger, Handbuch der Drogenkunde, Wilhelm Maudrich-Verlag, Wien-Bonn-Bern (1960), Bd. V, S. 116
 - 73) H. A. HOPPE, Drogenkunde, Verlag de Gruyter u. Co., Hamburg (1958), S. 18
 - 74) H. D. WULFF u. E. STAHL, Naturwiss. 47, 114 (1960)
 - 75) H. THOMS u. K. BECKSTROEM, Chem. Ber. 34, 1021 (1901)
 - 76) R. KELKAR, ref. Chem. Abstr. 152 (1934)
 - 77) H. ROJAN, Pharmaz. Ztg. 46, 243 (1901)
 - 78) E. GILDEMEISTER u. F. HOFMANN, Akademie-Verlag, Berlin (1956), Bd. IV, S. 437
 - 79) F. ŠORM u. Mitarb., Collect. Czechoslov. Chem. Commun. 4, 512 (1953)

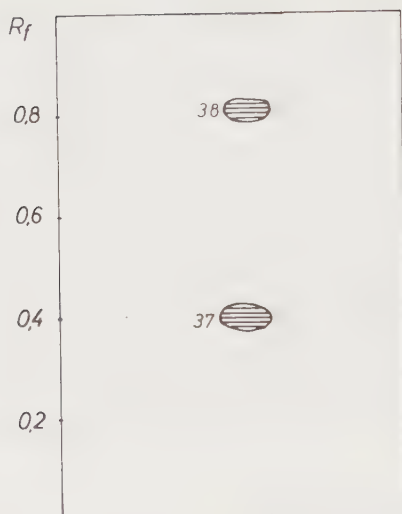


Abb. 8

UV-Fluoreszenzbild von Tinctura Calami nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung im System Äthylacetat gesättigt mit 10%igem Ammoniak

Ihr Verhalten gegenüber einigen Sprühreagenzien deutete zunächst auf Phenolcumarin- oder Hydroxyzimtsäurederivate. Die durchgeführte Lactontrennung eines Ätherauszugs und Dünnschichtchromatographie der erhaltenen Fraktionen ergab aber, daß keine der Verbindungen einem dieser Typen zugehören konnte, da sie in der Neutralfraktion verblieben waren. Eine Zuordnung zu bekannten Inhaltsstoffen aus der Calmuswurzel gelang nicht.

Zur Identifizierung von Tinctura Calami müssen somit die Hydroxyphenylpropanderivate Asaron, Eugenol und Methyleugenol herangezogen werden (s.S. 29-30).

b) Chromatographische Analyse der charakteristischen Bitterstoffe

Nach Durchführung der dünnschichtchromatographischen Vorproben, die bereits eine weitgehende Identifizierung der Einzeldrogen erlaubten, galten die weiteren Untersuchungen dem Nachweis der charakteristischen Bitterstoffe.

Zum Nachweis des G e n t i o p i k r i n s in Radix Gentianae und Herba Centaurii wird der Drogenauszug im System wassergesättigtes Butanol chromatographiert. Das Sichtbarmachen erfolgt durch Bildung des tiefrot gefärbten Tripheynylformazans⁸⁰⁾ oder durch die nach Besprühen mit Chloramin/Trichloressigsäure, Antimon-III-chlorid oder Schwefelsäure auftretende blauweiße, hell- oder gelbgrüne Fluoreszenz.

Amarogentin und die Aglukone der beiden Enzianbitterstoffe können in diesem System nicht nachgewiesen werden. Sie liegen zusammen mit den Xanthonderivaten an der Lösungsmittelfront. Die Prüfung auf A m a r o g e n t i n erfolgte nach Chromatographie des Drogenauszugs im System wassergesättigtes Äthylacetat. Amarogentin reagiert nicht mit TTC, obwohl nach der Hydrolyse ein Mol Glukose nachgewiesen werden konnte⁸¹⁾. Dies dürfte, wie KORTE⁸²⁾ vermutet, darauf zurückzuführen sein, daß im Gentiopikrinmolekül nicht der glykosidisch gebundene Zucker, sondern die Cyclohalbacetalgruppierung für die Reaktion verantwortlich ist.

Zum Nachweis dienen die nach Besprühen mit Antimon-III-chlorid⁸³⁾ oder Schwefelsäure entstehenden blau fluoreszierenden Zersetzungsprodukte.

80) F.KORTE, Chem.Ber. 87, 512 (1954)

81) F.KORTE, Chem.Ber. 89, 2404 (1956)

82) F.KORTE, Chem.Ber. 87, 512 (1954)

83) F.KORTE, Chem.Ber. 88, 704 (1955)

Die Versuche, Enzianauszüge auch auf Grund der Bitterstoff-aglukone zu identifizieren, verliefen infolge des uneinheitlichen Verlaufs der hydrolytischen Spaltung ergebnislos. Nach der von KILIANI⁸⁴⁾ vorgeschlagenen Hydrolysenmethode erhielten wir im Dünnschichtchromatogramm mehrere blau fluoreszierende Zonen, von denen die eine auf Grund ihrer positiven Reaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin dem Eugentiogenin⁸⁵⁾ zugeordnet werden dürfte. Da diese Substanz aber nicht in allen untersuchten Enzianauszügen nachgewiesen werden konnte, war sie für eine Charakterisierung nicht heranzuziehen.

Die Chromatographie des ebenfalls bitter schmeckenden Disaccharids *G e n t i o b i o s e* (6-(β -d-Glucosido-)d-Glucose) erfolgte im System Aceton/Butanol/Wasser (5:4:1), sein Nachweis durch Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure, mit der der Zucker unter Ausbildung eines gelbgrüngefärbten Komplexes reagierte.

Zum Nachweis des *L o g a n i n s* und seines Aglukons Loganetin in *Folia Trifolii Fibrini* wurde der Drogenauszug im System Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) chromatographiert. Die Identifizierung wurde durch die nach Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure gebildete Rotfärbung oder die nach Behandeln mit Schwefelsäure oder Chloramin-Trichloressigsäure auftretende leuchtend blaue bzw. blauweiße Fluoreszenz vorgenommen.

Zum Nachweis des *P i m p i n e l l i n s* (5,6-Dimethoxy-7,8-furanocoumarin) in *Radix Pimpinellae* wurde der Drogenauszug im System Äther/Benzol (1:1) gesättigt mit 10%iger Essigsäure chromatographiert. Zur Identifizierung eignete sich die Eigenfluoreszenz und die Fluoreszenzänderung nach Besprühen mit methanolischer Kalilauge. Mit Diazoverbindungen tritt die Kuppelung erst nach Ringöffnung im alkalischen Medium ein.

84) H.KILIANI, Chem.Ber. 63, 2866 (1936)

85) F.KORTE, Chem.Ber. 87, 769 (1954)

Der Nachweis des *N a r i n g i n s* (4',5-Dihydroxy-flavon-7-rhamnoglucosid) und seines Hydrolyseproduktes *Naringenin* in *Pericarpium Aurantii* erfolgte nach Chromatographie des Drogenauszugs im System Äthylacetat/Äthylmethylketon/Ameisensäure/Wasser (5:3:1:1)⁸⁶⁾. Zur Charakterisierung läßt sich die Eigenfluoreszenz und die Fluoreszenzänderung nach Besprühen mit basischem Bleiacetat, Aluminiumchlorid, Magnesiumacetat und die Reaktion mit Echtblausalz B heranziehen.

Zum Nachweis des *A b s i n t h i n s* und *A n a b s i n t h i n s* in *Artemisia absinthium* wurde der Drogenauszug im System Äther, gesättigt mit 10%iger Essigsäure chromatographiert. Beide Verbindungen reagieren nach Besprühen mit Schwefelsäure unter Ausbildung eines im Tageslicht tiefrot gefärbten Komplexes, der unter der UV-Lampe ziegelrot erscheint. Mit Antimon-III-chlorid/Thionylchlorid⁸⁷⁾ und Phosphorsäure entstehen orangebraune bzw. gelbe Fluoreszenzzonen.

Der dritte von ŠORM aus *Herba Absinthii* isolierte Bitterstoff, das *A r t a b s i n*, ein Prochamazulen, war nur in *f r i s c h e n* Auszügen aus *Herba Absinthii* mit EP-Reagenz⁸⁸⁾ auffindbar. Länger gelagerte Zubereitungsformen gaben keine positive Reaktion mehr.

A c o r i n der Bitterstoff der Calmuswurzel konnte nicht nachgewiesen werden. Die chemische Struktur dieser Verbindung ist noch ungeklärt. Nach unseren Beobachtungen ist allerdings ziemlich wahrscheinlich, daß das Acorin nicht in glycosidischer Form vorliegt. Durch Ausschütteln mit Petroläther läßt sich die bittere Komponente der wässrig-alkoholischen Lösung quantitativ entziehen. Alle Versuche, in der Petrolätherfraktion nach Hydrolyse reduzierende Verbindungen nachzuweisen, blieben ergebnislos. Die Fraktionierung dieses Petroläther-

86) E.STAHL, Dünnschichtchromatographie, Springer-Verlag, Heidelberg (1962), S. 388

87) V.HEROUT, L.NOVOITNY u. F.ŠORM, Collect.Czechoslov.Chem.Commun. 21, 1485 (1956)

88) E.STAHL, Dtsch.Apotheker-Ztg. 93, 197 (1953)

extrakts an Aluminiumoxyd Woelm neutral und Dünnschichtchromatographie der brennend bitter schmeckenden Fraktionen ließ neben Eugenol und Methyleugenol drei weitere brennend scharf schmeckende nicht identifizierbare Verbindungen erkennen. Eine Trennung dieser Verbindungen durch erneute Chromatographie gelang nicht.

Der Nachweis von Rhizoma Calami in Drogenauszügen kann daher nicht durch Identifizierung des charakteristischen Bitterstoffs geführt werden. Zur Charakterisierung zogen wir die Hydroxyphenylpropanderivate Asaron, Eugenol und Methyleugenol heran. Nach Dünnschichtchromatographie der Drogenauszüge in Benzol läßt sich A s a r o n (2,4,5-Trimethoxy-1-propenylbenzol) durch Reaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin⁸⁹⁾ und Rotviolettffärbung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure⁹⁰⁾ oder Ausbildung einer violettblauen Fluoreszenz mit Brom-Essigsäure, die nach Behandeln mit Ammoniakdämpfen verschwindet, nachweisen. E u g e n o l (4-Hydroxy-3-methoxy-1-allyl-benzol) und M e t h y l e u g e n o l (3,4-Dimethoxy-1-allyl-benzol) liefern mit Anisaldehyd-Schwefelsäure eine Graugrün- bzw. Violettffärbung. Mit Antimon-III-chlorid entsteht ein graubrauner bzw. violettbraun gefärbter Komplex⁹⁰⁾.

Tabelle 8 gibt einen Überblick über die Nachweisverfahren für die Bitterstoffe der vorliegenden Drogenauszüge.

89) E.STAHL, Dünnschichtchromatographie, Springer-Verlag, Heidelberg (1962), S. 200

90) E.STAHL, Dünnschichtchromatographie, Springer-Verlag, Heidelberg (1962), S. 202

Bitterstoffdroge	Bitterstoff	Fließmittelsystem	Sprühreagenz	Farbreaktionen	
				TL	UV
Radix Gentianae	Gentiopikrin	wassergesättigtes Butanol (R _f 0.37 - 0.40)	TTC/KOH	rot	-
			Chloramin/Trichlor- essigsäure	-	weißblau
			Schwefelsäure	-	gelb
			Antimon-III-chlorid	-	gelbgrün
Amarogentin		wassergesättigtes Äthylacetat (R _f 0.31 - 0.35)	Schwefelsäure	-	blau
			Antimon-III-chlorid	-	blau
Gentiobiose		Aceton/Butanol/ Wasser (5:4:1) (R _f 0.57 - 0.59)	Anisaldehyd- Schwefelsäure	gelbgrün	-
Folia Trifolii Fibrini	Loganin	Butanol/Eisessig/ Wasser (4:1:5) (R _f 0.50 - 0.53)	Anisaldehyd- Schwefelsäure Schwefelsäure	violett- rot -	- blau
			Chloramin/Trichlor- essigsäure	-	weißblau
Radix Pimpinellae	Pimpinellin	Äther/Benzol (1:1) ges. mit 10% iger Essigsäure (R _f 0.85 - 0.86)	Eigenfluoreszenz methanolische Kalilauge	- - -	braun gelb

Fortsetzung siehe Seite 32

Bitterstoffdroge	Bitterstoff	Fließmittelsystem	Sprühreagenz	Farbreaktionen	
Pericarpium Aurantii	Naringin	Äthylacetat/Äthyl- methylketon/Amei- sensäure/Wasser (5:3:1:1) (R_f 0.40 - 0.43)	Eigenfluoreszenz	-	hellgelb
			Echtblausalz B	blaurot	-
			Magnesiumacetat	-	blaugrün
			basisches Bleiacetat	-	gelbgrün
Herba Absinthii	Absinthin	Äther ges. mit 10% i- ger Essigsäure (R_f 0.24 - 0.26) (R_f 0.10 - 0.13)	Aluminiumchlorid	-	blauweiß
			Schwefelsäure	rot	ziegelrot
			Antimon-III-chlorid/ Thionylchlorid	rotbraun	gelborange
			Phosphorsäure	grau	gelb
Rhizoma Calami ^{*)}	Asaron	Benzol (R_f 0.22 - 0.24)	2,4-Dinitrophenyl- hydrazin	orange	-
			Brom-Essigsäure	-	blau
			Anisaldehyd- Schwefelsäure	violett	-
	Eugenol	Benzol (R_f 0.32 - 0.33)	Antimon-III-chlorid	braunrot	-
			Anisaldehyd- Schwefelsäure	graubraun	-
	Methyleugenol	Benzol (R_f 0.40 - 0.42)	Antimon-III-chlorid Anisaldehyd- Schwefelsäure	graubraun braun- violett	- -

*) siehe Seite 33

II. Chromatographische Untersuchung bitterstoffhaltiger galenischer Zubereitungsformen

Um mit Hilfe dieses Verfahrens auch *M i s c h u n g e n* der vorliegenden Drogenauszüge zu identifizieren, mußten daher zunächst Versuche gemacht werden, die für die Einzeldrogen charakteristischen Inhaltsstoffe auch in Modellmischungen nachzuweisen. Hierzu trugen wir eine Mischung gleicher Volumenteile der Einzeldrogenauszüge und die Tinkturen nebeneinander auf die Kieselgelschicht auf und chromatographierten im System Äthylacetat gesättigt mit 10%igem Ammoniak. Die für die Einzeldrogen charakteristischen Fluoreszenzonen ließen sich nach Betrachten unter der UV-Lampe auch in der Mischung erkennen. Sie konnten nach Behandeln mit den entsprechenden Sprühreagenzien durch typische Fluoreszenzänderungen oder Farbreaktionen den zur Charakterisierung der Einzeltinkturen herangezogenen Inhaltsstoffen zugeordnet werden. Eine Unterscheidung der beiden gentiopikrinführenden *Enziandrogen* Radix Gentianae und Herba Centaurii wurde durch den Nachweis der Oleanolsäure getroffen. Den Nachweis der charakteristischen Bitterstoffe führten wir in der gleichen Weise, indem wir die Tinkturenmischung neben den Einzeltinkturen auf die Kieselgelschicht auftrugen und durch charakteristische Farbreaktionen identifizierten.

Tabelle 9 gibt einen Überblick über die zur Charakterisierung der einzelnen Bitterstoffdrogen herangezogenen Inhaltsstoffe.

***) Fußnote zu Tabelle 8, Seite 32:**

Der Bitterstoff in Rhizoma Calami läßt sich nicht nachweisen. Die Droge wird daher durch den Nachweis der Hydroxyphenylpropanderivate Asaron, Eugenol und Methyleugenol identifiziert.

T a b e l l e 9

Droge	Inhaltsstoffe
Radix Gentianae	G e n t i s s i n (4,7-Dihydroxy-2-methoxy-xanthon) I s o g e n t i s s i n (2,4-Dihydroxy-7-methoxy-xanthon) Bitterstoffe: G e n t i o p i k r i n (3-Glucosyl-hydroxy-2-oxo-6-isopropenyl-2,7α-dihydro-6H-furano-(2,3β)pyran) A m a r o g e n t i n G e n t i o b i o s e (6-(β-d-Glucosido-)d-Glucose)
Folia Trifolii Fibrini	S c o p o l e t i n (7-Hydroxy-6-methoxy-cumarin) Bitterstoff: L o g a n i n
Herba Centaurii	O l e a n o l s ä u r e Bitterstoffe: G e n t i o p i k r i n (3-Glucosyl-hydroxy-2-oxo-6-isopropenyl-2,7α-dihydro-6H-furano-(2,3β)pyran) A m a r o g e n t i n
Radix Pimpinellae	U m b e l l i p r e n i n (7-Hydroxy-cumarin-farnesyläther) I s o b e r g a p t e n (5-Methoxy-7,8-furanocumarin) P i m p i n e l l i n (5,6-Dimethoxy-7,8-furanocumarin) B e r g a p t e n (5-Methoxy-6,7-furanocumarin) I s o p i m p i n e l l i n (5,8-Dimethoxy-6,7-furanocumarin) S p h o n d i n (6-Methoxy-7,8-furanocumarin) U m b e l l i f e r o n (7-Hydroxy-cumarin) S c o p o l e t i n (7-Hydroxy-6-methoxy-cumarin) Bitterstoff: P i m p i n e l l i n

Fortsetzung Seite 35

setzung Tabelle 9

Inhaltsstoffe	Inhaltsstoffe
<i>Fructus Aurantii</i>	Bergapten (5-Methoxy-6,7-furanocumarin) Aesculetin (6,7-Dihydroxy-cumarin) Umbelliferon (7-Hydroxy-cumarin) Hesperetin (3',5,7-Trihydroxy-4'-methoxy-flavanon) Bitterstoff: Naringin (4',5-Dihydroxy-flavanon-7-rhamnoglu- cosid)
<i>Herba Absinthii</i>	Artemitin (5-Hydroxy-3,6,7-3',4'-pentamethoxy- flavon) Umbelliferon (7-Hydroxy-cumarin) Bitterstoffe: Absinthin Anabsinthin
<i>Rizoma Calami</i>	Asaron (2,4,5-Trimethoxy-1-propenyl-benzol) Eugenol (4-Hydroxy-3-methoxy-1-allyl-benzol) Methyleugenol (3,4-Dimethoxy-1-allyl-benzol)

a) Chromatographische Untersuchung bitterstoffhaltiger

Arzneispezialitäten

Um festzustellen, ob der zum Nachweis der einzelnen Bitterstoffdrogen aufgestellte Identifizierungsschlüssel auch für Zubereitungsformen gilt, die ein Gemisch dieser Ausgangsdrogen darstellen, untersuchten wir die Präparate:

1. Tinctura amara, ein Tinkturengemisch des DAB 6 und die Arzneispezialitäten,
2. Stomalit ^R,
3. Stomazet ^R,
4. Carminativum Hetterich ^R und
5. Gastribilintabletten ^R.

Zur Identifizierung der Ausgangsdrogen führten wir wieder die auf Seite 3 beschriebene dünnschichtchromatographische *V o r p r o b e* im System Äthylacetat gesättigt mit 10%igem Ammoniak durch. Zur Chromatographie verwendeten wir Ätherextrakte der einzelnen Kombinationspräparate. Sie enthielten die zur Charakterisierung der Ausgangsdrogen vorgeschlagenen lipophilen Inhaltsstoffe in angereicherter Form, während die störenden hydrophilen Inhaltsstoffe in der wässrigen Phase verblieben. Zum Vergleich wurden diese Ätherextrakte und die Einzeltinkturen nebeneinander chromatographiert. Die charakteristischen Fluoreszenzzonen wurden markiert und die Chromatogramme nacheinander mit methanolischer Kalilauge und Diazoreagenz behandelt. Auf diese Weise konnten die zur Charakterisierung der Ausgangsdrogen geeigneten Xanthon-, Cumarin- und Flavonderivate nebeneinander nachgewiesen werden.

Die *H a u p t u n t e r s u c h u n g* zum Nachweis der jeweiligen Bitterstoffe führten wir um Überlagerungen weitgehend auszuschließen, mit den aus den Stammlösungen gewonnenen Petroläther-, Äther und Äthylacetatlösungen durch. Die typischen Kalmusinhaltsstoffe wurden in der Petroläther-, Absinthin und Anabsinthin in der Äther- und Gentiopikrin, Amarogentin, Loganin und Naringin in der Äthylacetatfraktion identifiziert.

1. Chromatographie von *T i n c t u r a a m a r a*

nach DAB 6 ein Auszug aus Pericarpium Aurantii, Fructus Aurantii immaturi, Rhizoma Zingiberis, Radix Gentianae und Herba Centaurii.

Folgende Drogenbestandteile konnten nach dünnschichtchromatographischer *V o r u n t e r s u c h u n g* anhand ihrer charakteristischen Inhaltsstoffe ermittelt werden:

a) *P e r i c a r p i u m A u r a n t i i*

Identifizierte Verbindungen: Hesperetin, Umbelliferon, Aesculetin und Bergapten.

b) *R a d i x G e n t i a n a e*

Identifizierte Verbindungen: Gentisin und Isogentisin.

c) *Herba Centaurii*

Identifizierte Verbindung: Oleanolsäure.

Die Hauptuntersuchung zum Nachweis der charakteristischen Bitterstoffe erfolgte wie bei den folgenden Kombinationspräparaten nach den auf S. 27 - 32 beschriebenen Verfahren.

Pericarpium Aurantii konnte durch den Nachweis des Naringins, *Radix Gentianae* und *Herba Centaurii* durch den Nachweis des Gentiopikrins und Amarogentins identifiziert werden.

2. Chromatographie von *Stomalit Cesra*

Auszug aus *Radix Gentianae*, *Rhizoma Calami*, *Herba Centaurii*, *Radix Angelicae*, *Fructus Carvi*, *Fructus Foeniculi*, *Rhizoma Cedoariae*, *Flores Chamomillae romanae* und *Folia Mathae piperitae*.

Folgende Drogenbestandteile konnten nach dünn-schichtchromatographischer Voruntersuchung ermittelt werden:

a) *Radix Gentianae*

Identifizierte Verbindungen: Gentisin und Isogentisin

b) *Rhizoma Calami*

Identifizierte Verbindungen: Asaron, Eugenol und Methyl-eugenol

c) *Herba Centaurii*

Identifizierte Verbindung: Oleanolsäure

Bei der Hauptuntersuchung ließen sich *Radix Gentianae* und *Herba Centaurii* durch den Nachweis der Bitterstoffe Gentiopikrin und Amarogentin identifizieren.

3. Chromatographie von *Stomzet Zwintscher*

Mischung aus *Tinctura Absinthii*, *Gentianae*, *Calami* und *Chinae comp.*

Die durch dünn-schichtchromatographische Voruntersuchung ermittelten Drogenbestandteile sind:

- a) *Herba Absinthii*
Identifizierte Verbindung: Artemitin
- b) *Radix Gentianae*
Identifizierte Verbindungen: Gentisin und Isogentisin
- c) *Rhizoma Calami*
Identifizierte Verbindungen: Asaron, Eugenol, Methyl-eugenol

Bei der Hauptuntersuchung konnte die Anwesenheit von *Pericarpium Aurantii* durch den Nachweis des Naringins, von *Herba Absinthii* durch Identifizierung von Absinthin und Anabsinthin und von *Radix Gentianae* durch den Nachweis von Gentiopikrin und Amarogentin bestätigt werden.

4. Chromatographie von *Carminativum Hettelrich*

Auszug aus *Fructus Foeniculi*, *Fructus Carvi*, *Fructus Coriandri*, *Flores Chamomillae*, *Folia Menthae piperitae*, *Rhizoma Calami* und *Pericarpium Aurantii*.

Die dünnschichtchromatographische Voruntersuchung ergab folgende Ausgangsdrogen:

- a) *Rhizoma Calami*
Identifizierte Verbindungen: Asaron, Eugenol, Methyl-eugenol
- b) *Pericarpium Aurantii*
Identifizierte Verbindungen: Umbelliferon und Bergapten.
Da diese beiden Cumarinderivate auch in Auszügen aus *Fructus Foeniculi* vorliegen, konnten der Beweis für das Vorhandensein von *Pericarpium Aurantii* im Drogenauszug erst durch die Hauptuntersuchung nach Identifizierung des Naringins erbracht werden.

5. Chromatographie von *Gastribilin*-Tabletten *Galméda*

zusammengesetzt aus pulverisierter *Radix Gentianae*, *Herba*

Centaurii, Folia Trifolii Fibrini, Herba Benedicti, Cortex Quercus, Rhizoma Calami, Herba Millefolii, Folia Plantaginis und Flores Chamomillae.

Die dünn-schicht-chromatographische V o r u n t e r s u -
c h u n g eines Methanolextraktes führte zu folgendem Er-
gebnis:

- a) R a d i x G e n t i a n a e
Identifizierte Verbindungen: Gentisin und Isogentisin
- b) H e r b a C e n t a u r i i
Identifizierte Verbindung: Oleanolsäure
- c) F o l i a T r i f o l i i F i b r i n i
Identifizierte Verbindung: Scopoletin
- d) R h i z o m a C a l a m i
Identifizierte Verbindungen: Asaron, Eugenol, Methyleugenol.

R a d i x G e n t i a n a e und H e r b a C e n -
t a u r i i konnten bei der H a u p t u n t e r s u -
c h u n g durch den Nachweis des Gentiopikrins und A-
marogentins, F o l i a T r i f o l i i F i b r i n i
durch Identifizierung des Loganins charakterisiert wer-
den.

Die unter 1 - 5 aufgeführten Untersuchungsergebnisse
lassen erkennen, daß Bitterstoffdrogen wie Radix Gen-
tianaee, Folia Trifolii Fibrini, Herba Centaurii, Peri-
carpium Aurantii, Herba Absinthii und Rhizoma Calami
auch wenn sie in Mischungen untereinander oder mit an-
deren Drogenauszügen vorliegen, eindeutig nebeneinander
bestimmt werden können. Die Analyse läßt sich relativ
schnell durchführen und erfordert nur geringe Mengen
an Untersuchungsmaterial (s.Exp.T.S.66).

III. Chromatographische Untersuchung bitterstoffhaltiger

Genußmittel

Da Bitterstoffdrogen neben ihrer arzneilichen Verwendung eine große Rolle in der Genußmittelindustrie zur Herstellung von Aperitifs und Magenlikören spielen, war eine weitere Untersuchungsreihe der Chromatographie dieser Auszüge gewidmet. Bitterweine und -liköre enthalten Bitterstoffdrogenauszüge nur in sehr geringer Konzentration. Die Lösungen wurden daher im Vakuum auf ein kleines Volumen eingeeengt und die Rückstände zur Entfernung der Zucker mit Äthylacetat ausgeschüttelt. Die Identifizierung der Ausgangsdrogen nach dünn-schichtchromatographischer Voruntersuchung war auch nach einer weiteren Fraktionierung der Lösung mit Petroläther und Äther unmöglich, da die zur Identifizierung herangezogenen Sekundärstoffe infolge Überlagerung nicht eindeutig nebeneinander nachgewiesen werden konnten.

Zur Ermittlung der Ausgangsdrogen beschränkten wir uns daher auf den Nachweis der charakteristischen Bitterstoffe. Zum Nachweis der typischen Kalmusinhaltssstoffe chromatographierten wir die Petrolätherlösung. Absinthin und Anabsinthin wiesen wir in der Äther-, Naringin, Gentiopikrin und Amarogentin in der Äthylacetatfraktion nach.

Als Untersuchungsmaterial wählten wir die Bitterliköre Boonecamp^R, Underberg^R und Dunnerkiel^R, die Reichelts Liköressenzen Stonsdorffer^R und Angostura-Bitter^R sowie einen Wermutwein italienischer Herkunft.

1. Chromatographie von Boonecamp / Kortüm

Dünn-schichtchromatographie im System Äthylacetat/Äthyl-methylketon/Ameisensäure/Wasser (5:3:1:1) führte zur Identifizierung von Naringin und im System wassergesättigtes Butanol zum Nachweis von Gentiopikrin und den beiden Xanthonderivaten. Die Prüfung auf Amarogentin verlief vermutlich infolge der geringen Konzentration negativ. Die Bitterwirkung dieses Magenlinköres dürfte daher weitgehend auf der Verwendung von G e n t i a n a -

und *Aurantium* - Auszügen beruhen.

2. Chromatographie von *U n d e r b e r g*

Außer Naringin war keiner der von uns in Betracht gezogenen Bitterstoffe auffindbar. Die Anwesenheit von *R a d i x G e n t i a n a e* im Drogenauszug ließ sich durch Identifizierung der Xanthonderivate beweisen. Das Fehlen der typischen Enzianbitterstoffe dürfte auf die Verwendung fermentierter Droge zurückzuführen sein. Die Intensität der für *Pericarpium Aurantii* und *Radix Gentianae* charakteristischen Fluoreszenzzonen ist bei Verwendung der gleichen Menge Ausgangsmaterial in diesem Magenlikör wesentlich geringer als bei dem unter 1. beschriebenen Booncamp. Hauptbestandteil dieses Präparates dürften ätherische Öle sein, da fast sämtliche Inhaltsstoffe in der Petrolätherfraktion und nach Chromatographie in lipophilen Lösungsmittelsystemen nachgewiesen werden konnten.

3. Chromatographie von *D u n n e r k i e l / Lauffenberg*

Es ließen sich neben Gentiopikrin, den beiden Xanthonderivaten und Naringin auch Eugenol, Methyleugenol und Asaron als charakteristische Inhaltsstoffe von *Rhizoma Calami* identifizieren. Zum Nachweis der Bitterstoffe genügten geringere Mengen an Untersuchungsmaterial als bei den unter 1. und 2. beschriebenen Präparaten. Fluoreszenzzonen, die durch vergleichende dünnschichtchromatographische Untersuchungen Bestandteilen anderer Bitterstoffdrogen zugeordnet werden konnten, waren nur in Spuren vorhanden, so daß dieser Magenlikör hauptsächlich aus Auszügen aus *R a d i x G e n t i a n a e*, *P e r i c a r p i u m A u r a n t i i* und *R h i z o m a C a l a m i* zusammengesetzt sein dürfte.

4. Chromatographie der Liköressenz *S t o n s d o r f e r*

Neben Naringin, Gentiopikrin und den beiden Xanthonderivaten waren Asaron und die typischen Absinthbitterstoffe zu identifizieren. Aus der Intensität der für *P e r i c a r p i u m A u r a n t i i* charakteristischen Fluoreszenz-

zonen kann man schließen, daß Auszüge dieser Droge Hauptbestandteil der Liköressenz sind. Auszüge aus *R a d i x G e n t i a n a e*, *H e r b a A b s i n t h i i* und *R h i z o m a C a l a m i* lagen in wesentlich geringerer Konzentration vor, konnten aber durch Chromatographie entsprechender Mengen in der Äthylacetat- und Petrolätherfraktion nebeneinander nachgewiesen werden.

5. Chromatographie der Liköressenz *A n g o s t u r a - B i t t e r*

Die Essenz besteht hauptsächlich aus einem Auszug von *Cortex Angosturae*, wie durch vergleichende Dünnschichtchromatographie mit einem Extrakt authentischer *Cortex Angosturae*-Droge in den Fließmittelsystemen wassergesättigtes n-Butanol und Äther/Benzol (1:1) gesättigt mit 10%iger Essigsäure nachgewiesen werden konnte. Daneben konnte *R h i z o m a C a l a m i* anhand der charakteristischen Hydroxyphenylpropanderivate identifiziert werden.

6. Chromatographie eines *W e r m u t w e i n s*

Bei der chromatographischen Analyse konnten wir neben Absinthin und Anabsinthin größere Mengen Umbelliferon identifizieren. Die hohe Umbelliferonkonzentration dürfte durch das besondere Herstellungsverfahren bedingt sein. Wermutkraut wird in den gärenden Most eingehängt, wodurch das leichter wasserlösliche Cumarinderivat in angereicherter Form in das Endprodukt gelangt. Die Fluoreszenzbilder, die wir nach Dünnschichtchromatographie der einzelnen Fraktionen und Vergleich mit authentischen Auszügen aus *Herba Absinthii* erhielten, stimmten weitgehend überein. Bestandteile anderer Bitterstoffdrogen konnten wir nicht nachweisen.

Das Ergebnis dieser Untersuchungsreihe zeigt, daß die genannten Bitterstoffdrogen wesentliche Bestandteile der von uns untersuchten Bitterliköre sind. Neben dem qualitativen Nachweis gestattet die Vergleichschromatographie auch annähernd quantitative Aussagen über den Gehalt an wirksamen

Bitterstoffen. Rückschlüsse auf die Güte eines Präparates lassen sich, solange nur die Bitterstoffe analysiert werden, nicht ziehen, da an der pharmakologischen Wirksamkeit dieser Auszüge neben den eigentlichen Bitterstoffen auch carminative und spasmolytische Komponenten beteiligt sind.

B. Quantitative Analyse der Gentianaceenbitterstoffe

I. Bisherige Methoden zur quantitativen Bestimmung von Bitterstoffen

Zu quantitativen Aussagen über die Bitterkeit einer Substanz wurde bisher fast ausschließlich die von WASICKY und Mitarbeitern⁹¹⁾ entwickelte *physiologische Bestimmungsmethode* herangezogen. Hierbei wird die Grenzkonzentration des gerade noch wahrnehmbaren bitteren Geschmacks ermittelt. Das Verfahren erfordert eine größere Anzahl von Versuchspersonen. Die Fehlerquote liegt nach unseren Beobachtungen trotz Ausschaltung äußerer Einflüsse wie Luftdruck- und Temperaturschwankungen und Eliminierung individueller Fehler durch Vergleich mit Standard-Brucinlösung (1:4 800 000) bei 4 - 5%.

Der einzige Versuch zur *chemischen Wertbestimmung* eines Bitterstoffs wurde bisher von KORTE⁹²⁾ unternommen. Er trennte einen Methanolauszug von *Gentiana lutea* L. papierchromatographisch auf, eluierte das Gentiopikrin und benutzte das bei der Reduktion mit Triphenyltetrazoliumchlorid gebildete tiefrot gefärbte Triphenylformazan zur photometrischen Bestimmung. Die Fehlerquote liegt nach seinen Angaben bei 3%. Diese bezieht sich lediglich auf die erhaltenen Meßwerte, schließt aber nicht die während des Chromatographier- und Elutionsvorgangs auftretenden Bitterstoffverluste ein. Außerdem läßt sich mit diesem Verfahren nur der Gentiopikringehalt bestimmen. Infolge seines niedrigen Bitterwerts ist aber Gentiopikrin für eine Qualitätsbeurteilung der Gentianaceendrogen *Radix Gentianae* und *Herba Centaurii* von geringer Bedeutung.

91) R. WASICKY, E. BARBIERI u. H. WEBER, *Anais. fac. fam. odontol. Univ. Sao Paulo* **2**, 113 (1942-1943); *ref. Chem. Abstr.* **39**, 5396 (1945)

92) F. KORTE, *Chem. Ber.* **87**, 512 (1954)

3. Ausarbeitung einer chemischen Bestimmungsmethode mit
Hilfe von Anthron

Bitterstoffe lassen sich bekanntlich nicht in einheitliche chemische Verbindungsklassen einordnen wie etwa die Alkaloide, Terpene, Cumarine oder Flavone. Ihre Vertreter können jedem dieser Verbindungstypen angehören. Eine Beziehung zwischen Konstitution und bitterem Geschmack wurde bisher noch nicht festgestellt. Daher ist es auch nicht möglich, eine für die Erregung der Geschmacksinneszellen verantwortliche Molekülkonfiguration oder -gruppierung durch eine chemische Umsetzung zu erfassen und für die quantitative Bestimmung aller Bitterstoffe auszunutzen. Jeder Bitterstoff würde eine seiner chemischen Struktur entsprechende individuelle Umsetzung erfordern. Will man eine bestimmte chemische Umsetzung zur quantitativen Bestimmung mehrerer Bitterstoffe heranziehen, gelingt dies nur, wenn gleiche Bauelemente im Molekül vorhanden sind. Der einzige Baustein, der den Bitterstoffglukosiden Gentiopikrin, Amarogentin, Loganin und dem bitteren Disaccharid Gentiobiose gemeinsam ist, ist die Glucose. Wir versuchten daher, Reaktionen der Zuckerkomponente für eine quantitative Bestimmung auszunutzen. Dadurch könnte gleichzeitig auf eine Isolierung der zur Aufstellung der Eichkurven benötigten Bitterstoffe verzichtet werden. Die unbekannte Konzentration der bitteren Komponente ließe sich aus Glucoseeichkurven mit Hilfe eines entsprechenden Umrechnungsfaktors bestimmen.

DREYWOOD und MORSE⁹³⁾ hatten bereits im Jahre 1947 festgestellt, daß Mono- und Polysaccharide im schwefelsauren Medium mit Anthron (9,10-Dihydro-9-keto-anthracen) eine beständige grüne Färbung liefern, die sich zum Kolorimetrieren verwenden läßt. VOUTE⁹⁴⁾ übernahm diese Reaktion zur quantitativen Bestimmung des Salicins.

3) R.DREYWOOD u. E.MORSE, Analytic.Chem. 19, 1012 (1947)
4) E.VOUTE, Pharm.Weekbl. 88, 144 (1953)

Die Reaktion beruht auf einer hydrolytischen Spaltung der Glucoside im schwefelsauren Medium. Die entstehende Glucose reagiert unter Wasserabspaltung zum Hydroxyaldehyd und unter weiterem Wasserverlust und Ringschluß zu Hydroxymethylfurfural⁹⁵⁾, das durch Kondensation mit Anthron den grünen Farbstoff liefert. Mißt man die Absorption dieser Lösungen, so zeigen alle gemessenen Proben, gleichgültig ob zur Umsetzung Glucose oder Glucosid (z.B. Gentiopikrin, s. Abb. 9) herangezogen wurde, ein Hauptmaximum bei 620 m μ .

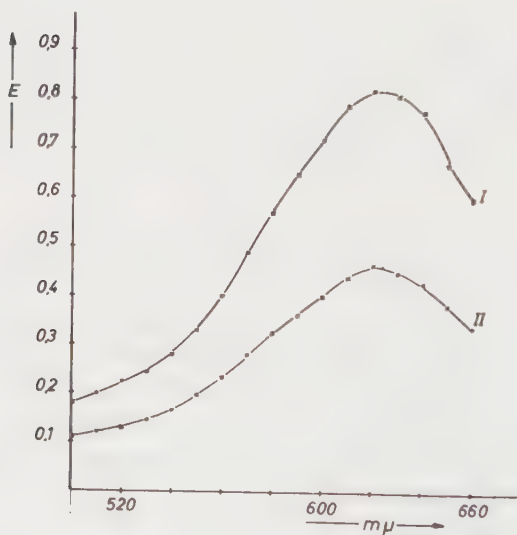


Abb. 9

Absorptionskurven von Glucose (I) und Gentiopikrin (II) nach Umsetzung mit Anthron in schwefelsaurer Lösung

95) L. SATTLER, Science 108, 207 (1948)

a) Ermittlung geeigneter Versuchsbedingungen

Zur Umsetzung verwendeten wir eine 0.2%ige Anthronlösung in konzentrierter Schwefelsäure⁹⁶⁾. Zur Darstellung der Farblösungen wurden entsprechende Mengen Glucose, Gentio- biose oder Bitterstoffglucosid in Wasser gelöst, unter Eiskühlung mit 10 ml Reagenzlösung versetzt, im siedenden Wasserbad 5 Minuten erhitzt und anschließend im Eisbad so- fort unterkühlt. Da das intermediär gebildete Hydroxymethyl- furfurool wasserdampflich ist und unter den Bildungsbe- dingungen leicht weiter zu Laevulin- und Ameisensäure zer- fällt⁹⁷⁾, liefert diese Methode nur bei Einhaltung der an- gegebenen Versuchsbedingungen reproduzierbare Werte. Ände- rung der Versuchsbedingungen und spektrophotometrische Kon- trolle der jeweiligen Versuchsansätze zeigte nach Durchfüh- rung einer Fehlerrechnung, daß wir unter den genannten Ver- suchsbedingungen im Rahmen unserer Untersuchungsreihe die kleinste Fehlerquote erhielten. Diese Änderungen bezogen sich auf die Menge der zugesetzten Reagenzlösung (5 - 15 ml), die Reaktionsdauer (1 - 10 min.), die Reaktionstemperatur (20 - 100°) und die Messung der Intensität der entstandenen Färbung im Zeiss-Spektrophotometer nach verschiedenen Zeit- intervallen (15 - 120 min.). 10 ml Reagenzlösung garantie- ren quantitative Umsetzung der gewählten Glukosekonzentra- tion. Kürzere Einwirkungsdauer und niedrigere Reaktions- temperaturen liefern keine reproduzierbaren Ergebnisse. Die Intensität der aufgetretenen Färbung bleibt im Zeitraum von 15 - 60 Minuten konstant.

96) F.D.SNELL u. C.T.SNELL, Colorimetric Methods of Analysis, D.van Nostrand Company Inc., Toronto, New York, London (1937), Bd.III, S.207

97) P.KARRER, Lehrbuch der org.Chemie, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1959), S.370

b) Aufstellung der Eichkurven

Nach Festlegung der geeigneten Versuchsbedingungen wurden für die Bitterstoffglucoside Gentiopikrin, Amarogentin und Loganin, sowie für Glucose und Gentiobiose die entsprechenden Eichkurven aufgestellt. Die hierfür erforderlichen Saccharide Glucose und Gentiobiose wurden aus dem Handel bezogen, die Bitterstoffglucoside Gentiopikrin und Amarogentin nach einer von KORTE⁹⁸⁾⁹⁹⁾ angegebenen Vorschrift aus frischen Wurzeln von *Gentiana lutea* L. isoliert. Loganin stellte uns Herr Professor Merz zur Verfügung^{*)}.

Bestimmte Mengen dieser Verbindungen wurden zur Aufstellung der Eichgeraden in Wasser gelöst, unter den auf S. 47 beschriebenen Bedingungen in die Anthronkondensationsprodukte überführt und die Extinktionen der erhaltenen Farblösungen bei 620 m μ im Spektralphotometer gemessen. Pro Eichkurve wurden je 10 Bestimmungen im Konzentrationsbereich von 1-4 μ g im Abstand von 1 μ g durchgeführt. Die aus diesen Werten resultierenden Eichgeraden sind in Abb. 10 graphisch dargestellt.

98) F.KORTE, Chem.Ber. 87, 512 (1954)

99) F.KORTE, Chem.Ber. 88, 704 (1955)

*) Wir danken Herrn Professor Dr.Merz, Direktor des pharm.-chem.Instituts der Universität Freiburg i.Br., für die Überlassung von Loganin.

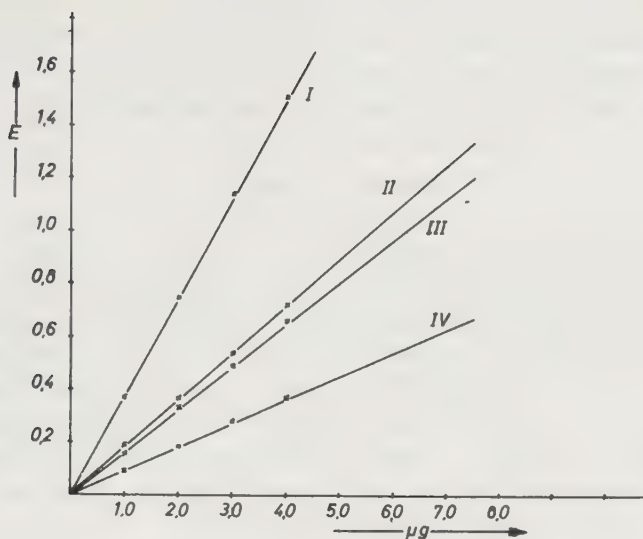


Abb. 10

Eichkurven der Anthronkondensationsprodukte mit Glucose (I), Gentiopikrin (II), Loganin (III) und Amarogentin (IV)

Wie aus den Eichgeraden hervorgeht, erfüllen sie in dem untersuchten Konzentrationsbereich das Lambert-Beer'sche Gesetz. Die Farbintensität nimmt mit steigendem Molekulargewicht ab. Die Eichgeraden für Glucose und Gentiobiose entsprechen einander, da letztere während der Hydrolyse quantitativ zu Glucose aufgespalten wird.

Stehen die genannten Bitterstoffglucoside und das Disaccharid zur Aufstellung der Eichkurven nicht zur Verfügung, so läßt sich ihre Konzentration durch Umrechnen auf den Glucosestandard bestimmen. Der Umrechnungsfaktor wird aus den Molekulargewichten des Bitterstoffs und der Glucose ermittelt (Umrechnungsfaktor = $\frac{\text{Mol.Gew.Bitterstoff}}{\text{Mol.Gew.Glucose}}$). Er beträgt für Amarogentin 3.75, für Gentiopikrin 1.97 und für Loganin 2.17.

Zum Nachweis, daß die aufgestellten Eichkurven den Anforderungen entsprechen, führten wir eine Fehlerrechnung durch. Wie aus Tabelle 10 hervorgeht, liegen die wahrscheinlichen Fehler zwischen 0.11 und 0.44%.

T a b e l l e 10

Verbindung	M	$10^8 x f^2$	f_m	F_m	E_m	mittl. Fehler
Glucose	3.70	42 600	0.00686	0.00216	0.370-0.0022	0.22%
Gentiopikrin	1.77	100 900	0.0106	0.00334	0.177-0.0033	0.33%
Amarogentin	0.92	180 000	0.0141	0.0044	0.092-0.0044	0.44%
Loganin	1.57	175 900	0.0139	0.0044	0.157-0.0044	0.44%
Gentiobiose	3.79	11 300	0.00336	0.0011	0.379-0.0011	0.11%

Bezeichnung: m = Quotient

M = Mittelwertquotient

f = Fehler zum Mittelwert

f_m = mittlerer Fehler der Einzelmessung

F_m = mittlerer Fehler des Mittelwerts

$E_m = M \pm F_m$

c) Aufstellung von Eichkurven nach dünn-schichtchromatographischer Trennung der einzelnen Bitterstoffe

Um die für Reinsubstanzen ausgearbeitete Methode auch auf die Bestimmung der Bitterstoffe in den vorliegenden Drogenauszügen zu übertragen, mußten wir diese zunächst einer chromatographischen Trennung unterwerfen. Die Umsetzung kann nicht im Gesamtextrakt durchgeführt werden, da anwesende Zucker die Reaktion stören.

Die bei säulen- und papierchromatographischer Isolierung auftretenden Elutionsverluste ließen sich durch dünn-schichtchromatographische Auftrennung der Pflanzenextrakte vermeiden. Da auch während des Chromatographierens Substanzverluste auftreten können, mußte zunächst geprüft werden,

ob die zur Aufstellung der Eichkurven herangezogenen Extinktionswerte mit den nach Dünnschichtchromatographie entsprechender Mengen der einzelnen Bitterstoffe erhaltenen Meßwerten übereinstimmen. Zu diesem Zweck trugen wir die zur Aufstellung der Eichgeraden verwendeten Mengen Glucose, Gentiobiose, Gentiopikrin, Amarogentin und Loganin auf Kieselgel-G-Schichten auf und entwickelten in den auf S. 31 - 32 beschriebenen Systemen. Nach dem Trocknen der Chromatogramme wurde ein Parallelstreifen mit dem entsprechenden Sprühreagenz behandelt, die Bitterstoffzone auf dem unbesprühten Chromatogramm markiert, abgelöst und in ein Reagenzglas überführt. Die Umsetzung erfolgte unter den auf Seite 47 beschriebenen Bedingungen. Nach dem Erkalten wurde vom Kieselgel abzentrifugiert und die erhaltenen Farblösungen bei 620 m μ spektrophotometriert.

Die Extinktionsmittelwerte der einzelnen Verbindungen nach Einwaage und nach Dünnschichtchromatographie sind in Tabelle 11 gegenübergestellt.

T a b e l l e 11

Verbindung	Extinktionsmittelwerte nach Einwaage			Extinktionsmittelwerte nach Dünnschichtchromatographie		
	1 μ g	2 μ g	3 μ g	1 μ g	2 μ g	3 μ g
Gentiopikrin	0.177	0.358	0.536	0.170	0.350	0.490
Amarogentin	0.092	0.190	0.280	0.086	0.175	0.255
Loganin	0.157	0.330	0.507	0.156	0.315	0.500
Gentiobiose	0.379	0.756	1.16	0.372	0.760	1.15
Glucose	0.370	0.75	1.15	0.371	0.748	1.14

Die Extinktions-Abweichungen für Glucose, Gentiobiose und Loganin liegen, wie aus Tabelle 11 hervorgeht, innerhalb der ermittelten Fehlergrenze, so daß die aufgestellten Eichkurven nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung

der Drogenextrakte herangezogen werden können. Abweichungen ergeben sich beim Gentiopikrin und Amarogentin. Die hier auftretenden Substanzverluste dürften auf eine chemische Umwandlung während des Chromatographierens zurückzuführen sein. Die Gentiopikrin- und Amarogentinkonzentration in Drogenextrakten muß nach anderen Eichkurven (Verlustkurven) bestimmt werden. Für ihre Aufstellung werden die nach Dünnschichtchromatographie der Bitterstoffglucoside ermittelten Extinktionswerte herangezogen (s. Abb. 11).

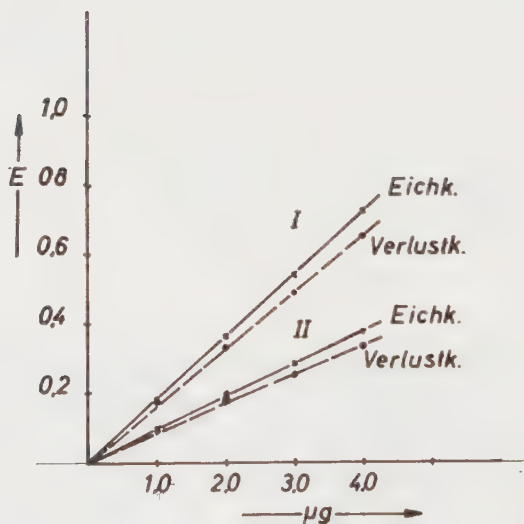


Abb. 11

Eich- und Verlustkurven der Anthronkondensationsprodukte mit Gentiopikrin (I) und Amarogentin (II)

Nach der Fehlerrechnung ergibt sich für die Verlustkurve des Gentiopikrins ein mittlerer Fehler von 0.77%, für die des Amarogentins von 0.45%.

Wie aus den Eichgeraden hervorgeht, nimmt mit steigendem Substanzeinsatz auch der Verlust an Bitterstoffglucosid zu. Er liegt bei Gentiopikrin zwischen 0.0 und 9.8%, bei Amarogentin zwischen 0.0 und 18.8%. Da die Verlustquote eine lineare Funktion darstellt und die in Drogenextrakten ermittelten Bitterstoffkonzentrationen weniger als 3 µg betragen, kann diese Eichkurve für Bestimmungen verwendet werden.

d) Quantitative Bitterstoffbestimmung in Drogenauszügen

Zur quantitativen Bestimmung der Bitterstoffe wurden die nach Vorschrift des DAB 6 bereiteten alkoholischen Auszüge von Radix Gentianae, Herba Centaurii und Folia Trifolii Fibrini herangezogen. Zur Bestimmung von Gentiobiose wurden 0.01 ml, von Gentiopikrin und Loganin 0.1 ml der Stammlösungen auf Kieselgel-G-Schichten aufgetragen. Zur Amarogentinbestimmung waren 0.1 ml der auf 1/10 ihres Volumens konzentrierten Gentianaceenauszüge notwendig. Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte für die Bestimmung von Gentiopikrin im System wassergesättigtes Butanol, von Amarogentin im System wassergesättigtes Äthylacetat und von Gentiobiose im System Aceton/Butanol/Wasser (5:4:1). Zur Auftrennung der Auszüge aus Menyanthes trifoliata L. wurde das System Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) verwendet. Nach Anfärben eines Parallelstreifens wurde die Bitterstoffzone markiert, abgelöst und die Kieselgelschicht wie bei der Aufstellung der Verlustkurven beschrieben, behandelt. Wir erhielten folgendes, in Tabelle 12 zusammengestelltes Ergebnis.

T a b e l l e 12

Droge	% Amarogentin	% Gentiopikrin	% Gentiobiose	% Loganin
Radix Gentianae Handelsware H ₂ O-Gehalt 7.8%	a) 0.065 b) 0.063	a) 1.75 b) 1.68	6.5	-
Herba Centaurii Handelsware H ₂ O-Gehalt 8.0%	-	a) 0.55 b) 0.51	-	-
Folia Trifolii Fibrini Handelsware H ₂ O-Gehalt 8.1%	-	-	-	a) 0.60 b) 0.58

Die Werte a) wurden aus den Bitterstoffeichkurven, die Werte b) aus Glucoseeichkurven mit Hilfe des entsprechenden Umrechnungsfaktors ermittelt.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, zeigen die erhaltenen Werte untereinander gute Übereinstimmung. In Herba Centaurii konnte keine Gentiobiose nachgewiesen werden. Der Amarogentingehalt war für eine quantitative Bestimmung zu gering.

III. Vergleich der auf chemischem und physiologischem Wege ermittelten Bitterstoffkonzentrationen

Zum Vergleich der auf physiologischem Wege erhaltenen Daten mit den nach der Anthronmethode ermittelten Ergebnissen führten wir mit dem Enzianauszug eine physiologische Bitterwertbestimmung durch.

Als Bitterwert einer Droge bezeichnet man die Verdünnung, die unter Voraussetzung der normalen Geschmacks-Empfindlichkeit gerade noch deutlich bitter empfunden wird. Die Aussagen beziehen sich auf 1 g Untersuchungsmaterial.

Durch Einengen des Enzianauszugs im Vakuum und Aufnehmen des Rückstandes in der entsprechenden Menge Trinkwasser stellten wir uns Verdünnungsreihen dar, die einer Verdünnung von

1:51 200; 1:48 100; 1:44 400; 1:43 100; 1:40 900; 1:39 000; 1: 35 700 bzw. 1:34 200 entsprachen. Diese Lösungen wurden von 12 Versuchspersonen auf ihren bitteren Geschmack geprüft. Sie begannen mit der am niedrigsten konzentrierten Lösung und setzten die Untersuchung der Reihe so lange fort, bis eine Konzentration als zweifelhaft, die nächst höhere als deutlich bitter empfunden wurde. Sieben der zwölf Versuchspersonen bezeichneten die Verdünnung 1:35 700, drei die Verdünnung 1:37 300 und nur zwei die Verdünnung 1:39 000 bereits als bitter. Als Mittelwert für den Enzianauszug errechnet sich hieraus eine Verdünnung von 1:37 000. Diese Werte beziehen sich auf 1 g Drogenmaterial. Zum Vergleich der beiden Methoden müssen daher die spektrophotometrisch ermittelten Werte ebenfalls auf 1 g Drogenmaterial umgerechnet werden.

Der Bitterwert für Amarogentin wurde von KORTE¹⁰⁰⁾ als 1:58 000 000, für Gentiopikrin als 1:12 000 festgesetzt. Für Gentiobiose konnten wir durch physiologische Bestimmung nach Eichung der Versuchspersonen mit Standard-Brucinlösung einen Bitterwert von 1:1500 ermitteln. Diese Werte beziehen sich lt. Definition auf 1 g Bitterstoff. Legen wir die in dem vorliegenden Enzianauszug spektrophotometrisch ermittelten %-Gehaltsangaben zugrunde, dann enthält 1 g Drogenmaterial 0.00065 g Amarogentin, 0.0175 g Gentiopikrin und 0.065 g Gentiobiose. Für Amarogentin errechnet sich dann bezogen auf 1 g Ausgangsdroge ein Bitterwert von 1:37 700, für Gentiopikrin ein Bitterwert von 1:200 und für Gentiobiose ein Bitterwert von 1:100. Durch Addition der Bitterwerte der drei bitteren Komponenten der Enzianwurzel erhalten wir dann einen Bitterwert von 1:38 000, der sich jetzt ebenfalls auf 1 g Drogenmaterial bezieht.

100) F.KORTE, Chem.Ber. 88, 704 (1955)

Obwohl wir in dem untersuchten Fall eine relativ gute Übereinstimmung der auf physiologischem und chemischem Wege erhaltenen Bitterstoffkonzentrationen erzielen konnten, liefert die chemische Bestimmungsmethode exaktere und differenziertere Ergebnisse. Bei Einkaltung der angegebenen Versuchsbedingungen sind die Werte jederzeit reproduzierbar, während die physiologischen Daten nur Relativwerte darstellen, da sie von dem physiologischen Verhalten der einzelnen Versuchspersonen sowie Luftdruck- und Temperatureinflüssen abhängig sind. Außerdem wird im Gegensatz zum biologischen Verfahren, das auch die bitter schmeckenden Substanzen erfaßt, die keine pharmakologische Wirkung besitzen, nur der Gehalt der eigentlichen Bitterstoffe bestimmt. Die Bestimmung kann auch in Auszügen, die Tannine oder ätherisches Öl enthalten, deren Abtrennung mit Caseinpulver eine weitere Fehlerquelle der physiologischen Methode darstellt, durchgeführt werden.

Der Hauptvorteil gegenüber dem bisher üblichen Verfahren liegt darin, daß nunmehr eine selektive Bestimmung der einzelnen in einer Droge enthaltenen Bitterstoffe möglich ist. Bitterstoffdrogen enthalten meist mehrere Bitterstoffe, die sich in ihrer chemischen Struktur nur unwesentlich, in ihrer pharmakologischen Wirksamkeit aber merklich unterscheiden. Besteht zwischen diesen Substanzen ein Zusammenhang, dann muß eine durch pH-Änderung, Enzymeinwirkung oder Autoxydation hervorgerufene Konzentrationsänderung eines Bitterstoffes die Abnahme eines anderen zur Folge haben. Bestimmt man den Gesamtbitterstoffgehalt jeweils als Summe der Einzelkomponenten, so können die Bedingungen, die eine maximale pharmakologische Wirksamkeit gewährleisten, ermittelt werden.

IV. Vergleichende Untersuchungen über den Bitterstoffgehalt verschiedener Enzianwurzeln

Die Literaturangaben über den Bitterwert der Enzianwurzeln liegen zwischen 1:10 000 und 1:80 000¹⁰¹⁾. Ob diese Unterschiede auf Ungenauigkeit der physiologischen Bestimmungsmethode oder auf die Art der verwendeten Ausgangsdroge bzw. Umwandlung während der Lagerung und Verarbeitung zurückzuführen sind, wurde bisher nicht untersucht.

a) Bestimmung des Bitterstoffgehalts in Wurzeln verschiedener Enzianarten

Die Stammpflanzen von Radix Gentianae DAB 6 sind *Gentiana lutea* L., *Gentiana pannonica* L., *Gentiana purpurea* L. und *Gentiana punctata* L.. Eine bekannte Verfälschung der Enziandroge sind die Wurzeln von *Gentiana asclepiadea* L.. In einer ersten Versuchsreihe bestimmten wir den Bitterstoffgehalt alkoholischer Auszüge der verschiedenen Wurzeln. Die ermittelten Bitterstoffkonzentrationen gehen aus Tabelle 13 hervor.

T a b e l l e 13

Ausgangsdroge	% Amarogentin	% Gentiopikrin	% Gentiobiase
<i>Gentiana lutea</i> L.	0.0775	2.13	6.5
<i>Gentiana pannonica</i> L.	0.085	2.27	6.5
<i>Gentiana purpurea</i> L.	0.116	2.72	5.5
<i>Gentiana punctata</i> L. *)	0.125	0.80	2.3
<i>Gentiana asclepiadea</i> L.	0.074	2.32	3.5

101) F.GSTIRNER, Prüfung und Verarbeitung von Arzneidrogen, Springer-Verlag, Heidelberg (1955), S.29

*) Die für *Gentiana punctata* ermittelten Werte können nicht unmittelbar mit den übrigen verglichen werden, da es sich hier-bei um eine länger gelagerte Droge handelt.

Die Unterschiede in der Gentiopikrin- und Amarogentinführung von *Gentiana lutea* L., *Gentiana pannonica* L. und *Gentiana asclepiadea* L. sind, wie aus der Tabelle hervorgeht, gering. *Gentiana purpurea* L. und *Gentiana punctata* L. weisen dagegen einen wesentlich höheren Amarogentingehalt auf. Hieraus lassen sich die von GSTIRNER¹⁰²⁾ nach physiologischer Wertbestimmung gemachten Befunde, wonach die Wurzeln von *Gentiana purpurea* und *punctata* die höchsten Bitterwerte zeigen, bestätigen.

Sieht man von *Gentiana punctata*, deren geringer Gentiobiosegehalt durch enzymatische Veränderung während der Lagerung bedingt sein könnte, ab, so enthält *Gentiana asclepiadea* L. am wenigsten Gentiobiose.

b) Bestimmung des Bitterstoffgehalts nach Luft- bzw. Gefrier-
trocknung der verschiedenen Enzianwurzeln.

Um festzustellen, welchen Einfluß die A r t d e r T r o c k n u n g auf den Bitterstoffgehalt der einzelnen Enzianwurzeln besitzt, wurde dieser in einer zweiten Versuchsreihe nach Gefriertrocknung, schneller Lufttrocknung und langsamer Trocknung des Drogenmaterials in feuchter Atmosphäre bestimmt. Die bei den verschieden vorbehandelten Wurzeln gefundenen Bitterstoffgehalte sind in Tabelle 14 zusammengefaßt.

102) F.GSTIRNER, Prüfung und Verarbeitung von Arzneidrogen, Springer-Verlag, Heidelberg (1955), S.30

T a b e l l e 14

Ausgangsdroge	% Amarogentin	% Gentiopikrin	% Gentiobiose
<u>Gentiana lutea L.</u>			
Gefrieretrocknung	0.086	2.60	7.7
schnelle Lufttrocknung	0.0775	2.13	6.5
langsame Lufttrocknung	0.080	1.87	6.3
<u>Gentiana pannonica L.</u>			
Gefrieretrocknung	0.087	2.75	8.0
schnelle Lufttrocknung	0.085	2.27	6.5
<u>Gentiana purpurea L.</u>			
Gefrieretrocknung	0.116	2.75	5.5
schnelle Lufttrocknung	0.116	2.72	5.5
<u>Gentiana asclepiadea L.</u>			
Gefrieretrocknung	0.082	2.61	5.0
schnelle Lufttrocknung	0.074	2.32	3.5

Wie aus der Tabelle hervorgeht, ist der Gesamtbitterstoffgehalt in gefriergetrockneten Wurzeln mit Ausnahme von *Gentiana purpurea* höher als der in luftgetrocknetem Drogenmaterial. *Gentiana purpurea* unterscheidet sich lediglich durch einen geringeren Gentiopikringehalt in luftgetrockneter Droge. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß die Wurzeln, bevor sie verarbeitet werden konnten, bereits mehrere Tage in frischem Zustand gelagert wurden.

Der Wassergehalt von gefriergetrocknetem Drogengut liegt bei 7.2%, von luftgetrocknetem bei 7.8%. Daher kann der niedrigere Gesamtbitterstoffgehalt in luftgetrockneten Wurzeln nicht durch einen höheren Wassergehalt gegenüber der gefriergetrockneten Droge bedingt sein, sondern muß auf eine durch oxydative oder enzymatische Vorgänge während der Trocknung hervorgerufene Abnahme der Bitterstoffe zurückgeführt werden.

Daß während der Trocknung Bitterstoffverluste auftreten können, ersehen wir auch aus den nach langsamer Trocknung in feuchter Atmosphäre erhaltenen Meßergebnissen, wonach

der Gentiopikrin- und Gentiobiosegehalt gegenüber gefriergetrocknetem oder unter normalen Bedingungen luftgetrocknetem Drogengut weiterhin absinkt.

c) Bestimmung des Bitterstoffgehalts in Enzianwurzeln nach unterschiedlicher Lagerungsdauer

Der Prüfung, welcher Einfluß die Lagerungsdauer auf den Bitterstoffgehalt der Enzianwurzeln besitzt, galt eine weitere Versuchsreihe. Tabelle 15 gibt einen Vergleich des Bitterstoffgehaltes von mehrere Jahre gelagerte und frische, luftgetrocknete Enzianwurzel.

T a b e l l e 15

Ausgangsdroge	% Amarogentin	% Gentiopikrin	% Gentiobiose
<u>Gentiana lutea L.</u>			
60 Jahre gelagert	0.148	1.01	1.8
frisch	0.077	2.13	0.5
<u>Gentiana purpurea L.</u>			
36 Jahre gelagert	0.154	0.45	2.5
frisch	0.116	2.72	5.5
<u>Gentiana punctata L.</u>			
28 Jahre gelagert	0.124	0.80	2.3
frisch	-	-	-

Aus dieser Tabelle geht eindeutig hervor, daß der Gentiopikrin- und Gentiobiosegehalt mit zunehmender Lagerung sinkt, während der Amarogentingehalt ansteigt.

Um festzustellen, ob diese Veränderungen nur in der Trockendroge oder auch in Lösungen zu beobachten sind, bestimmten wir den Bitterstoffglucosidgehalt der von uns bereiteten Auszüge ein zweites Mal nach 6monatiger Lagerung. Tabelle 16 gibt einen vergleichenden Überblick über den Bitterstoffglucosidgehalt in frischen bzw. 6 Monate gelagerten Enzianauszügen.

T a b e l l e 16

Ausgangsdroge	% Amarogentin	% Amarogentin nach 6 Monaten	% Gentio- pikrin	% Gentio- pikrin n. 6 Mon
<u>gentiana lutea L.</u>				
gefriertrocknung	0.086	0.088	2.60	2.27
schnelle Lufttrockn.	0.0775	0.081	2.13	2.07
<u>gentiana pannonica L.</u>				
gefriertrocknung	0.087	0.090	2.75	2.62
schnelle Lufttrockn.	0.085	0.089	2.27	2.15
<u>gentiana asclepiadea L.</u>				
gefriertrocknung	0.082	0.085	2.61	2.55
schnelle Lufttrockn.	0.074	0.079	2.32	2.23

Wie aus der Tabelle hervorgeht, können wir auch hier eine Zunahme des Amarogentin- und ein Absinken des Gentiopikrin-gehalts feststellen, wenngleich die Differenzen geringer sind als bei der Untersuchung des gelagerten Drogenmaterials (s.Tab.15). Beide Ergebnisse können nicht unmittelbar miteinander verglichen werden, da die Messungen nach verschiedenen Lagerungszeiten erfolgten.

Aus diesen Untersuchungsergebnissen dürfen wir schließen, daß die Schwankungen in der Bitterstoffkonzentration verschiedener Enzianwurzeln nicht oder zumindest nur unwesentlich auf eine Ungenauigkeit der physiologischen Bestimmungsmethode zurückzuführen sind, sondern zur Hauptsache auf der Art der verwendeten Ausgangsdroge, den Trocknungsbedingungen und der Lagerungsdauer beruhen.

Der niedrigere Gesamtbitterstoffgehalt luftgetrockneter gegenüber gefriergetrockneter Droge muß darauf zurückgeführt werden, daß während des Trocknungsprozesses ein Teil der Bitterstoffe enzymatisch aufgespalten wird. Aus dem

Anstieg der Amarogentin- und dem gleichzeitigen Sinken der Gentiopikrinkonzentration könnte man folgern, daß das Gentiopikrin ein Baustein des Amarogentins ist. Welche Zwischenstufen dabei durchlaufen werden, ist bisher nicht bekannt.

EXPERIMENTELLER TEIL

I. Herkunft der Drogen

Die offizinellen Bitterstofftinkturen wurden aus Drogen der Firma Duvernoy, Nachf., Stuttgart, hergestellt. Für vergleichende Untersuchungen zogen wir Tinkturen der Firma H. Unfried, München, heran.

Zur Isolierung und quantitativen Bestimmung der Enzianbitterstoffe verwendeten wir frische Wurzeln von *Gentiana lutea* L. des Botanischen Gartens in München. Frische Wurzeln von *Gentiana asclepiadea* L. und *Gentiana pannonica* L. wurden im Dachauer Moor bzw. in der Umgebung Pfrontens (Allgäu) gesammelt. Frische Wurzeln von *Gentiana purpurea* L. stellte uns Herr Professor Dr. Flück, Zürich (Schweiz), zur Verfügung. Länger gelagerte Wurzeln von *Gentiana lutea* L., *Gentiana purpurea* L. und *Gentiana punctata* L. stammten aus einem Herbarium der TH-München.

Zur Isolierung der Heracleumcumarine zogen wir frische, in der Umgebung Münchens gesammelte Wurzeln von *Heracleum sphondylium* L. heran. Für vergleichende Untersuchungen stellte uns der Botanische Garten München frische Wurzeln von *Pimpinella magna* L. und *Pimpinella saxifraga* L. zur Verfügung.

Zur Isolierung des Scopoletins aus *Menyanthes trifoliata* L. verwendeten wir frische Handelsware der Firma R. Hoffmann, Herschfeld/Saale, die zuvor durch Gefriertrocknung stabilisiert worden war.

Zur Isolierung des Umbelliferons aus *Artemisia absinthium* L. verwendeten wir Trockendroge der Firma Duvernoy, Nachf., Stuttgart.

II. Aufbereitung und Prüfung des Drogenmaterials

a) Trocknen der Frischdrogen

Zur T r o c k n u n g a n d e r L u f t wurde die Frischdroge von Radix Gentianae in etwa 3 mm dicke Stücke geschnitten und in einem trockenen, gut durchlüfteten Raum in dünner Schicht ausgebreitet.

Zur G e f r i e r t r o c k n u n g wurde die Frischdroge von Radix Gentianae ebenfalls in ca. 3 mm dicke Stücke, Folia Trifolii Fibrini in etwa 1 cm breite Streifen geschnitten, in dünner Schicht ausgebreitet und bei -20°C eingefroren. Der Wasserentzug erfolgte nach Überführung des tiefgefrorenen Drogenmaterials in eine LEYBOLD-Gefriertrocknungsanlage (G 07) durch Sublimation im Vakuum.

b) Wassergehaltsbestimmung

Der Wassergehalt des Drogenmaterials wurde nach einer von JUNGHANS¹⁰³⁾ angegebenen Methode bestimmt. Dabei wird das Wasser durch Destillation mit Xylol aus dem Drogenmaterial ausgetrieben, kondensiert und in einer graduierten Vorlage aufgefangen. Zur Vermeidung von Wasserverlusten durch Adsorption an das Lösungsmittel wurde ein durch Destillation mit Wasser gesättigtes Xylol verwendet. Pro Untersuchung benötigten wir 10.0 g feingepulvertes Drogenmaterial. Der Xylolzusatz betrug 50 ml. Von dieser Mischung destillierten wir 15 ml ab und trennten die im Auffanggefäß erhaltene Emulsion durch CO_2 -Bläschen, die wir durch Zugabe von 0.25 g Natriumhydrogencarbonat und 0.95 ml verdünnter Salzsäure erzeugten. Der Wasseranteil wurde direkt im graduierten Meßrohr abgelesen. Von den einzelnen Ergebnissen zogen wir jeweils 1 ml ab (=Menge der zugesetzten HCl + aus NaHCO_3 bei der Umsetzung gebildetes H_2O). Die gefundenen Meßwerte sind in Tabelle 17 zusammengestellt.

103) G. JUNGHANS, Dtsch. Apotheker-Ztg., 67 (1934), zit.nach F.Gstirner, Prüfung und Verarbeitung von Arzneidrogen, Springer-Verlag, Heidelberg (1955), S.76

T a b e l l e 17

Ausgangsdroge	aufgefangene Wassermenge ml	Wassergehalt %
Radix Gentianae, gefriergetrocknet	1.72	7.2
Radix Gentianae, luftgetrocknet	1.78	7.8
Herba Centaurii, luftgetrocknet	1.80	8.0
Folia Trifolii Fibrini, luftgetrocknet	1.81	8.1

Der Wassergehalt luftgetrockneter Drogen kann durch anschließende Gefriertrocknung vermindert werden. Der Gewichtsverlust von 10.0 g pulverisierter Enzianwurzel beträgt 0.56 g.

III. Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurden auf Kieselgel-G-Schichten Merck durchgeführt. Die einzelnen Dünnschichtchromatogramme (Höhe 20 cm, Breite 12 cm) wurden in verschlossenen Rundkammern (Höhe 26 cm, Durchmesser 15 cm) in den entsprechenden Fließmittelsystemen bis zu einer Höhe von 15 cm entwickelt.

a) Herstellung und Aufbereitung des Untersuchungsmaterials

Die offizinellen B i t t e r s t o f f t i n k t u r e n wurden nach Vorschrift des DAB 6 durch 10tägige Extraktion von 20.0 g pulverisierter Droge mit 100 ml 70%igem Äthanol bei Zimmertemperatur bereitet. Zur chromatographischen Untersuchung verwendeten wir 0.03 - 0.06 ml dieser Auszüge.

Zur Identifizierung der Ausgangsdrogen in den verschiedenen A r z n e i s p e z i a l i t ä t e n verwendeten wir 5.0 g Untersuchungsmaterial. Dieses wurde nacheinander 3mal mit je 15 ml Petroläther, Äther und Äthylacetat ausgeschüttelt und die erhaltenen Fraktionen im Va-

kuum auf 2 ml eingeengt. Für die dünnschichtchromatographische Analyse benötigten wir 0.03-0.06 ml dieser Lösungen.

Zur dünnschichtchromatographischen Identifizierung der Bitterstoffdrogen in bitterstoffhaltigen Genüssen mitteleln zogen wir je 50 ml Boonecamp^R und Underberg^R, 30 ml Dunnerkiel^R, 2 ml der Liköressenzen Stönsdorfer^R und Angostura-Bitter^R und 500 ml Wermutwein heran. Die Bitterliköre und der Wermutwein mußten vor der Fraktionierung zunächst auf ca. 10 ml eingeengt werden. Die konzentrierten Lösungen sowie die Liköressenzen wurden dann 5mal mit je 10 ml Petroläther, Äther und Äthylacetat ausgeschüttelt, die erhaltenen Fraktionen auf 2 ml konzentriert und 0.04 - 0.06 ml der einzelnen Fraktionen zur dünnschichtchromatographischen Auftrennung verwendet.

b) Lösungsmittelsysteme

	Laufzeit
1. Äthylacetat gesättigt mit 10%igem Ammoniak	60 Min.
2. Wassergesättigtes n-Butanol	180 Min.
3. Aceton/n-Butanol/Wasser (5:4:1)	120 Min.
4. Wassergesättigtes Äthylacetat	60 Min.
5. n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5)	180 Min.
6. Äthylacetat/Äthylmethylketon/Ameisensäure/Wasser (5:3:1:1)	60 Min.
7. Äther gesättigt mit 10%iger Essigsäure	45 Min.
8. Äther/Benzol (1:1) gesättigt mit 10%iger Essigsäure	45 Min.
9. Benzol	30 Min.
10. Diisopropyläther/Aceton (75:30)	45 Min.
11. Äthylacetat/Methanol/Diäthylamin (70:20:15)	45 Min.

System 1 dient zum Auftrennen der 7 vorliegenden Bitterstofftinkturen. System 2 - 9 wird zum Nachweis der charakteristischen Bitterstoffe und die Systeme 10 und 11 zur Identifizierung der Oleanolsäure herangezogen.

c) Sprühreagenzien

Nach dem Abdunsten des Lösungsmittels wurden die Chromatogramme mit den entsprechenden Sprühreagenzien behandelt und die auftretenden Farbreaktionen im Tageslicht oder unter der UV-Lampe beobachtet:

1. Kalilauge: 3%ige Lösung von Kaliumhydroxyd in Methanol
2. Echtblausalz B: Frisch bereitete 0.5%ige Lösung.
Nachbehandlung: Besprühen mit n/10 NaOH.
Zum Nachweis nichtphenolischer Cumarinderivate werden die Chromatogramme mit 1%iger alkoholischer Kalilauge besprüht, 10 Minuten bei 100° getrocknet und erst dann mit dem Diazoreagenz behandelt.
3. Eisen-III-chlorid: 1%ige Lösung in Äthanol.
4. Basisches Bleiacetat: Liquor Plumbi subaceticici DAB 6
5. Antimon-III-chlorid: 20%ige Lösung von Antimon-III-chlorid in Chloroform.
6. Chlorsulfonsäure: 5 ml Chlorsulfonsäure werden unter Eiskühlung vorsichtig in 10 ml Eisessig gelöst.
Nachbehandlung: Die Chromatogramme werden 5 Minuten auf 130° erhitzt.
7. Diazotierte Sulfanilsäure:
Reagenz A: 0.5 g Natriumnitrit werden in 250 ml Wasser gelöst.
Reagenz B: 0.8 g Natriumsulfanilat werden in 245 ml Wasser gelöst und 5 ml konzentrierte Salzsäure zugesetzt. Die Reagenzlösungen werden im Kühlschrank aufbewahrt. Vor dem Besprühen werden gleiche Teile beider Lösungen vermischt, indem man A langsam zu B gibt.
Zum Nachweis nichtphenolischer Cumarinderivate werden die Chromatogramme mit 1%iger alkoholischer Kalilauge vorbehandelt und 10 Minuten bei 100° getrocknet.
8. Aluminium-III-chlorid: 1%ige methanolische Lösung.
9. Schwefelsäure: 50 Tropfen Schwefelsäure (d 1.84) werden mit 100 ml absolutem Äthanol vermischt.
Nachbehandlung: Die Chromatogramme werden 10 Minuten bei 110° erhitzt.

10. Peroxyd-Eisen-III-chlorid:

Reagenz A: 0.5%iges Wasserstoffsuperoxyd.

Reagenz B: 2%ige wässrige Eisen-III-chloridlösung.

Die Chromatogramme werden mit Reagenz A besprüht, 5 Minuten bei 105° getrocknet, mit Reagenz B nachbesprüht und bei 105° erwärmt bis dunkle Flecken erscheinen.

11. Triphenyltetrazoliumchlorid:

Reagenz A: 0.2%ige Lösung von Triphenyltetrazoliumchlorid in wassergesättigtem n-Butanol.

Reagenz B: 2 n methanolische Kalilauge.

Vor dem Besprühen werden gleiche Teile beider Lösungen vermischt.

Nachbehandlung: Die Chromatogramme werden 20 Minuten bei 80° in wasserdampfgesättigter Atmosphäre erwärmt.

12. Chloramin-Trichloressigsäure:

10 ml einer frisch bereiteten 0.3%igen wässrigen Chloraminlösung werden bei Bedarf mit 40 ml einer 25%igen Lösung von Trichloressigsäure in 96%igem Äthanol vermischt. Nachbehandlung: Die Chromatogramme werden 10 Minuten bei 110° erhitzt.

13. Anisaldehyd-Schwefelsäure: Frisch bereitete Lösung von 0.5 ml Anisaldehyd in 50 ml Eisessig unter Zusatz von 1 ml Schwefelsäure (d 1.84).

Nachbehandlung: Die Chromatogramme werden bis zum Auftreten farbiger Zonen bei 110° erhitzt.

14. Antimon-III-chlorid/Thionylchlorid: 20%ige Lösung von Antimon-III-chlorid in Chloroform unter Zusatz von 20% Thionylchlorid.

15. Phosphorsäure: Orthophosphorsäure/Wasser (1:1)

Nachbehandlung: Die Chromatogramme werden 10 Minuten bei 120° erhitzt.

16. Brom-Essigsäure: 0.5 ml Brom werden in 50 ml Eisessig und 50 ml Wasser gelöst.

Nachbehandlung: Die Chromatogramme werden 5 Minuten bei 100° erhitzt.

IV. Versuche zur Isolierung und Anreicherung der Bitterstoffe

a) Isolierung von Gentiopikrin

Die Isolierung erfolgte in Anlehnung an ein von KORTE¹⁰⁴⁾ beschriebenes Verfahren.

500 g frische Wurzeln von *Gentiana lutea* L. wurden in kleine Stücke zerschnitten, mit 600 ml siedendem Methanol versetzt, 15 Minuten zum Sieden erhitzt, scharf abgepreßt und diese Extraktion unter gleichen Bedingungen noch 2mal wiederholt. Anschließend wurde die Methanollösung filtriert und sofort im Vakuum eingeeengt. Die zurückbleibende wässrige Lösung schüttelten wir 15mal mit je 80 ml wassergesättigtem Äthylacetat aus, trockneten über Natriumsulfat und destillierten das Lösungsmittel im Vakuum ab. Der Rückstand (6.5g) wurde aus Äthylacetat/Aceton (9:1) umkristallisiert. Ausbeute 1.8 g; Schmelzpunkt 190° (Kofler unkorrt.); Literatur: Smp. 191°. Die Reinheitsprüfung erfolgte dünnschichtchromatographisch im System wassergesättigtes n-Butanol und Besprühen mit Antimon-III-chlorid bzw. Chloramin-Trichloressigsäure.

b) Isolierung von Amarogentin

Die Gentiopikrinmutterlauge wurde im Vakuum zur Trockne eingeeengt, der Rückstand (ca. 3.0 g) in 15 ml Chloroform gelöst und in Anlehnung an ein von KORTE¹⁰⁵⁾ angegebenes Verfahren säulenchromatographisch getrennt. Die Chloroformlösung brachten wir auf eine Säule (Höhe 35 cm, Durchmesser 4 cm) in die wir 300 g Aluminiumoxyd Woelm neutral mit Chloroform eingeschlämmt hatten. Durch Elution mit 500 ml Chloroform/Methanol (9:1) und 300 ml Methanol konnten nicht bittere Begleitstoffe abgetrennt werden. Mit Methanol/Wasser (1:1) erhielten wir ein intensiv bitter schmeckendes Eluat, in dem nach dünnschichtchromatographischer Prüfung im System wassergesättigtes n-Butanol Amaro-

104) F.KORTE, Chem.Ber. 87, 512 (1954)

105) F.KORTE, Chem.Ber. 88, 704 (1955)

gentin neben Gentiopikrin nachgewiesen werden konnte. Zur Trennung der beiden Bitterstoffglucoside wurde das Eluat im Vakuum eingeengt und der verbleibende Rückstand (0.8 g) an 100 g Ederol-Zellulose Nr. 221 rechromatographiert. Letztere schlämmten wir mit wassergesättigtem Amylalkohol an, brachten sie in die Säule ein und wuschen mehrere Male mit dem Lösungsmittel durch. Nach dem Auftragen der konzentrierten Bitterstoffglucosidlösung eluierten wir solange mit wassergesättigtem Amylalkohol, bis das Eluat nicht mehr bitter schmeckte. Gentiopikrin konnte mit diesem Lösungsmittel nicht eluiert werden, Amargentin lief mit der Lösungsmittelfront durch. Nach Abdestillieren des Elutionsmittels im Vakuum erhielten wir ein gelblich-gefärbtes schaumiges Rohprodukt, das zur Entfernung der farbigen Bestandteile mehrmals mit Chloroform ausgekocht wurde. Nach öfterem Umfällen des Rückstandes aus Tetrahydrofuran mit Cyclohexan erhielten wir ein weißes, voluminöses Pulver, das sich nach dünnschichtchromatographischer Prüfung im System wassergesättigtes Äthylacetat und Besprühen mit Antimon-III-chlorid bzw. Schwefelsäure als reines Amargentin erwies. Versuche, dieses Pulver umzukristallisieren, verliefen ergebnislos. Ausbeute 21 mg. Schmelzpunkt 179° (Kofler uncorr.); Literatur: Smp. $178 - 180^{\circ}$.

c) Anreicherung der Absinthbitterstoffe Absinthin und Anabsinthin

Zur Anreicherung der Absinthbitterstoffe wurde ein von ŠORM¹⁰⁶⁾ angegebenes Verfahren nachgearbeitet.

1. Petrolätherextrakt

250 g Herba Absinthii wurden mit etwa 900 ml Petroläther ($45 - 60^{\circ}$) erschöpfend im Soxhlet extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Den Rückstand (etwa 10 g) lösten wir in 80 ml Petroläther und

106) F. ŠORM, L. NOVOTNÝ u. V. HEROUT, Collection Czechoslov. Chem. Commun. 21, 1485 (1956)

35 ml Äthanol und schüttelten die Lösung nach Zugabe von 40 ml Wasser durch. Die Unterphase wurde abgetrennt und die Petrolätherschicht 10mal mit je 25 ml 60%igem Äthanol ausgeschüttelt. Nach Einengen der wässrig-alkoholischen Auszüge auf etwa 25 ml wurde der Rückstand 3mal mit je 25 ml Äther extrahiert und die ätherischen Auszüge nach dem Trocknen über Natriumsulfat wieder auf ein Volumen von etwa 25 ml konzentriert. Über Nacht bildete sich ein wachsartiger Rückstand, der einige zitronengelbe Kristalle enthielt. Nach Umkristallisieren aus Xylol erhielten wir 2 mg Artemitin, das zum dünnenschichtchromatographischen Nachweis dieser Verbindung verwendet wurde. Schmelzpunkt 160° (Kofler unkor.); Literatur Smp. 161.5° .

2. Äthanolextrakt

Die mit Petroläther vorextrahierte Droge wurde an der Luft getrocknet und anschließend im Perkulator mit kaltem 96%igen Äthanol extrahiert. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels verblieb ein dunkelgrüner zäher Extrakt (etwa 23 g), der nacheinander mit je 35 ml Äthanol, Petroläther, Benzol und Wasser versetzt wurde. Nach dem Ausschütteln wurde die Unterphase abgetrennt und die Oberphase noch 4mal mit je 60 ml 50%igem Äthanol extrahiert. Die vereinigten wässrig-alkoholischen Auszüge engten wir im Vakuum ein und schüttelten den Rückstand 5mal mit je 40 ml Äther aus. Nach Abdestillieren des Äthers im Vakuum erhielten wir einen intensiv bitter schmeckenden Rückstand (3.5 g). Dieser wurde in wenig Benzol aufgenommen und an 250 g Aluminiumoxyd Woelm neutral (Säulenhöhe 35 cm, Durchmesser 4 cm) chromatographiert. Die Entwicklung des Chromatogramms erfolgte zunächst mit Benzol. Die weiterhin verwendeten Lösungsmittel sind in Tabelle 18 zusammengestellt. Insgesamt wurden 27 Fraktionen à 50 ml aufgefangen.

T a b e l l e 18

Fraktion	Lösungsmittel	Geschmack
1 - 7	Benzol	nicht bitter
8 - 11	Benzol/Äther (9:1)	nicht bitter
12 - 13	Benzol/Äther (8:2)	nicht bitter
14 - 19	Äther	b i t t e r
20 - 22	Äther/Äthanol (49:1)	nicht bitter
23 - 24	Äther/Äthanol (49:1)	b i t t e r
25 - 27	Äthanol	b i t t e r

Nach Angaben von ŠORM¹⁰⁷⁾ entsprechen die Fraktionen 14 - 19 dem Absinthin, 23 und 24 dem Anabsinthin und 25 - 27 einem Oxydationsprodukt des Absinthins. Nach papierchromatographischer Trennung in dem von ihm angegebenen System Wasser/Äthanol (9:1) lagen die Inhaltsstoffe der drei chromatographisch gewonnenen bitteren Fraktionen in der Lösungsmittelfront. Eine Trennung konnte erst nach Dünnschichtchromatographie im System Äther gesättigt mit 10%iger Essigsäure erreicht werden. Absinthin liegt im R_f -Bereich 0.24 - 0.26, Anabsinthin im Bereich 0.10 - 0.13 und das Oxydationsprodukt des Absinthins bei R_f 0.08.

Auf eine weitere Reinigung durch Umkristallisieren wurde wegen der geringen Substanzmenge verzichtet.

d) Anreicherung des Kalmusbitterstoffs Acorin

1. Petrolätherextrakt

250 g Rhizoma Calami wurden mit etwa 800 ml Methanol im Soxhlet erschöpfend extrahiert, das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert, der Rückstand in 100 ml Wasser aufgenommen und so lange mit Petroläther extrahiert, bis die wässrige Lösung nicht mehr bitter schmeckte.

107) F. ŠORM u. L. NOVOTNÝ u. V. HEROUT, Collection. Czechoslov. Chem. Commun. 21, 1485 (1956)

Die Petrolätherfraktion wurde im Vakuum konzentriert und der Rückstand, etwa 10 g eines dunkelbraunen viskösen Sirups, an 500 g Aluminiumoxyd Woelm neutral chromatographiert (Säulenhöhe 50 cm, Durchmesser 6 cm). Die Entwicklung der Säule erfolgte zunächst mit Petroläther, die weiterhin verwendeten Lösungsmittel sind in Tabelle 19 zusammengestellt. Insgesamt wurden 43 Fraktionen à 100 ml gewonnen.

T a b e l l e 19

Fraktion	Lösungsmittel	Geschmack
1 - 4	Petroläther	nicht bitter
5 - 9	Petroläther	brennend scharf
10 - 13	Petroläther/Benzol (9:1)	brennend scharf
14 - 22	Petroläther/Benzol (9:1)	nicht bitter
23 - 30	Benzol	nicht bitter
31 - 35	Benzol/Äther (9:1)	nicht bitter
36 - 42	Äther	nicht bitter
43	Äthanol	nicht bitter

2. Bitterstofffraktion

Die brennend scharf schmeckenden Fraktionen 5 - 13 wurden chromatographisch untersucht. Nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung in Benzol und Anfärben mit Antimon-III-chlorid bzw. Anisaldehyd-Schwefelsäure konnten wir neben Eugenol (R_f 0.32) und Methyleugenol (R_f 0.41) drei weitere grüngrau bzw. braunviolett gefärbte Zonen (R_f 0.34, 0.38 und 0.40) erkennen. Diese Zonen wurden auf einem unbesprühten Parallelchromatogramm markiert, abgelöst und mit 1 ml Methanol eluiert. Nach Abzentrifugieren des Kieselgels wurde das Eluat mit 5 ml Wasser verdünnt und der Geschmack dieser Lösungen bestimmt. Da die Eluate der drei Zonen den gleichen brennend scharfen Geschmack besaßen und auch nach Rechromatographie an Aluminiumoxyd Woelm neutral mit

Petroläther keine chromatographisch reinen Fraktionen erhalten werden konnten, verzichteten wir auf eine weitere Reinigung.

V. Hydrolysen der Bitterstoffglucoside

a) Gentiopikrin und Amarogentin

5 mg Gentiopikrin bzw. Amarogentin wurden mit 1 ml einer Mischung aus konzentrierter Salzsäure, Essigsäure und Wasser (7:11:2) 30 Minuten im siedenden Wasserbad hydrolysiert. Die gebildeten Aglucone wurden mit Äther extrahiert und die ätherischen Lösungen zur dünn-schichtchromatographischen Untersuchung verwendet.

b) Acörin

10 ml eines 20%igen Äthanolauszugs wurden erschöpfend mit Petroläther extrahiert und 500 mg des nach Abdunsten des Petroläthers verbleibenden Rückstands mit 1 ml 1 n Schwefelsäure 30 Minuten im siedenden Wasserbad hydrolysiert. Nach Neutralisation der Lösung mit festem Bariumcarbonat wurde vom ausgefallenen Bariumsulfat abzentrifugiert und die erhaltene Lösung zur dünn-schichtchromatographischen Untersuchung verwendet.

VI. Isolierung der dünn-schichtchromatographisch identifizierten Cumarinderivate

a) Isolierung von Scopoletin aus Menyanthes trifoliata L.

500 g gefriergetrocknete Folia Trifolii Fibrini wurden im Soxhlet erschöpfend mit etwa 1.5 l Äther extrahiert und der Rückstand nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum in heißem Wasser aufgenommen. Nach 3stündigem Digerieren dekantierten wir von der wässrigen Lösung ab,

schlammten die Rückstände mehrere Male mit heißem Wasser an und engten die vereinigten wässrigen Lösungen im Vakuum auf ein kleines Volumen ein. Nach 12stündigem Stehen im Kühlschrank konnte der an der Oberfläche abgeschiedene Chlorophyllkuchen entfernt werden. Die wässrige Lösung wurde im Vakuum eingeengt und der verbleibende Rückstand (etwa 6.0 g dunkelbraun, halbfest) einer Lactontrennung unterworfen. Hierzu schüttelten wir den Rückstand nach Aufnahme in 100 ml Äther vorsichtig 10mal mit je 25 ml 0.5%iger wässriger Kalilauge aus. Dünnschichtchromatographische Untersuchung zeigte, daß die Phenolcumarine quantitativ in der alkalischen Lösung enthalten waren, so daß von einer weiteren Untersuchung der Ätherfraktion abgesehen werden konnte. Die alkalische Lösung wurde mit konzentrierter Salzsäure angesäuert, 5mal mit je 25 ml Äther extrahiert, die ätherische Lösung mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Es verblieben etwa 1 g eines dunkelbraun gefärbten, dickflüssigen Rückstands. Dieser wurde in Äther gelöst und durch Ausschütteln mit einer wässrigen Natriumhydrogencarbonatlösung von organischen Säuren befreit. Da die dünnschichtchromatographische Untersuchung zeigte, daß auch ein Teil des Scopoletins in die Hydrogencarbonatlösung übergang, verzichteten wir auf eine Entfernung der Säuren, säuerten die Hydrogencarbonatlösung mit konzentrierter Salzsäure an und extrahierten die Lösung 5mal mit je 25 ml Äther. Die vereinigten Ätherfraktionen engten wir im Vakuum ein. Der verbleibende Rückstand (etwa 0.8 g) wurde zur Trennung von Oxyzimtsäurederivaten an Aluminiumoxyd Woelm neutral chromatographiert (Säulenhöhe 35 cm, Durchmesser 4 cm). Durch Elution mit Methanol konnten diese weitgehend abgetrennt werden. Anschließend wurde das Scopoletin mit einer Methanol/Wassermischung (1:1) aus der Säule herausgelöst. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels unterwarfen wir die erhaltene Rohfraktion einer Sublimation unter vermindertem Druck. Ausbeute 60 mg. Schmelzpunkt 204° (Kofler unkor.); Literatur Smp. $204 - 205^{\circ}$.

UV-Maxima: Max.I = 230 m μ (log ϵ = 4.141)

Max.II = 256 m μ (log ϵ = 3.840)

Scopoletin C₁₀H₈O₄ (192.16) Ber. C 62.50 H 4.20

Gef. C 62.10 H 4.24

IR-Spektrum: C=O-Lactonbande 1721 cm⁻¹.

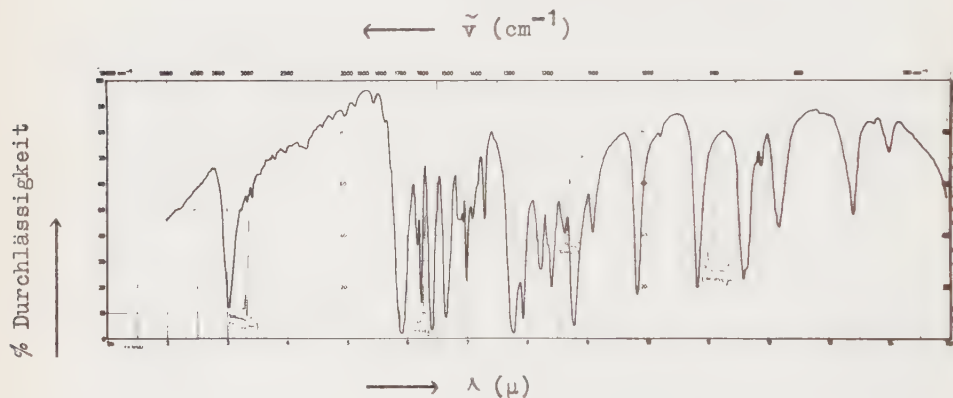


Abb. 12

IR-Spektrum von Scopoletin

b) Isolierung von Umbelliferon aus Artemisia absinthium L.

250 g Herba Absinthii wurden erschöpfend mit etwa 800ml Methanol im Soxhlet extrahiert, der Rückstand nach Entfernen des Lösungsmittels mehrmals mit heißem Wasser digeriert und der abgeschiedene Chlorophyllkuchen nach Stehen über Nacht abgehoben. Die wässrige Lösung engten wir im Vakuum zur Trockne ein, lösten den Rückstand (4.5 g) in wenig Methanol und chromatographierten die Methanollösung an Aluminiumoxyd Woelm neutral (Säulenhöhe 50 cm, Durchmesser 4.4 cm). Beim Eluieren mit Methanol erhielten wir eine chromatographisch reine Umbelliferonfraktion. Das nach Einengen im Vakuum und mehrtägigem Stehen erhaltene Rohprodukt konnte durch Sublimation unter vermindertem Druck gereinigt werden. Ausbeute 0.47 g.

Schmelzpunkt 228° (Kofler unkor.); Literatur: Smp. $228 - 230^{\circ}$.

UV-Maxima: MaxI = 211 m μ (log ϵ = 4.129)

Max.II = 325 m μ (log ϵ = 4.137)

Umbelliferon $C_9H_6O_3$ (162.15) Ber. C 66.66 H 3.73

gef. C 66.39 H 3.58

IR-Spektrum: C=O-Lactonbande 1721 cm^{-1} .

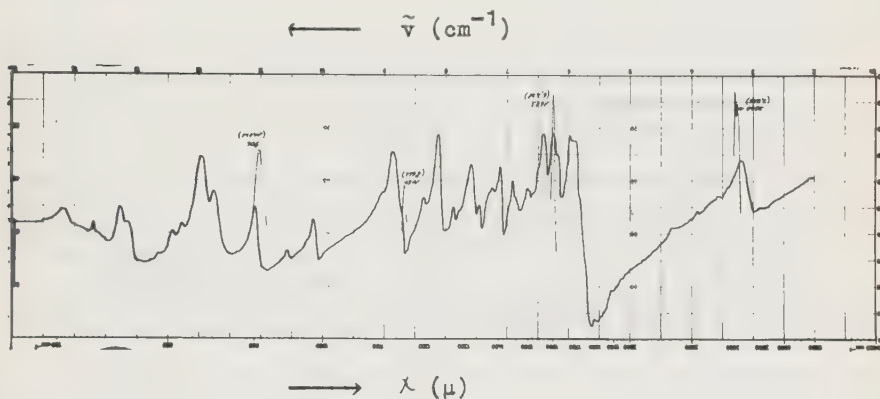


Abb. 13

IR-Spektrum von Umbelliferon

c) Isolierung von Umbelliprenin, Umbelliferon und
Scopoletin aus Heracleum sphondylium L.

500 g Radix Heraclei sphondylii wurden erschöpfend mit etwa 1.3 l Äther im Soxhlet extrahiert. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum verblieben etwa 25 g eines dunkelbraun gefärbten, zähflüssigen Sirups. Dieser wurde zunächst einer Lactontrennung unterworfen. Hierzu nahmen wir den Rückstand in 150 ml Äther auf und ließen durch diese Lösung solange 0.5%ige wässrige Kalilauge tropfen, bis eine Probe der alkalischen Flüssigkeit beim Ansäuern mit konzentrierter Salzsäure nur noch eine schwa-

che Trübung ergab. Die alkalische Lösung, die neben organischen Säuren auch die Phenolcumarine enthielt, wurde 3mal vorsichtig mit je 100 ml Äther ausgeschüttelt und die Ätherschicht mit der ätherischen Lösung vereinigt. Die alkalische Lösung säuerten wir mit konzentrierter Salzsäure an, schüttelten 6mal mit je 50 ml Äther aus und engten die vereinigten Ätherfraktionen im Vakuum ein. Es verblieben ca. 2 g eines dunkelbraun gefärbten, viskösen Rückstands.

Dünnschichtchromatographische Untersuchung zeigte, daß auch ein Teil der nichtphenolischen Cumarinderivate in den alkalischen Auszug gelangt war. Wir versuchten daher auf adsorptionschromatographischem Wege eine Trennung zu erzielen. Der Rückstand wurde in wenig Benzol aufgenommen und an 500 g Aluminiumoxyd Woelm neutral chromatographiert. (Säulenhöhe 50 cm, Durchmesser 6 cm). Durch Elution mit Benzol/Äthylacetat (9:1) konnten Umbelliprenin und die Furanocumarine abgetrennt werden.

1. Umbelliprenin

Die Trennung des Umbelliprenins von den Furanocumarinen erfolgte nach Rechromatographie an 300 g Aluminiumoxyd Woelm neutral (Säulenhöhe 35 cm, Durchmesser 3 cm). Durch Elution mit Benzol/Äthylacetat (95:5) konnte das Umbelliprenin abgetrennt werden, die Furanocumarine sind mit diesem Lösungsmittel nicht eluierbar. Das im UV-Licht violettblau fluoreszierende Eluat hinterließ nach Abdestillieren des Elutionsmittels einen hellgelben sirupösen Rückstand, der nach Aufnahme in absolutem Äthanol kristallisierte. Ausbeute 8 mg. Schmelzpunkt $61 - 62^{\circ}$ (Kofler unkor.); Literatur: Smp. $61 - 63^{\circ}$.

UV-Maxima: Max.I = 219 m μ (log ϵ = 3.908)
 Max.II = 324 m μ (log ϵ = 4.153)

IR-Spektrum: C=O-Lactonbande 1721 cm^{-1} .

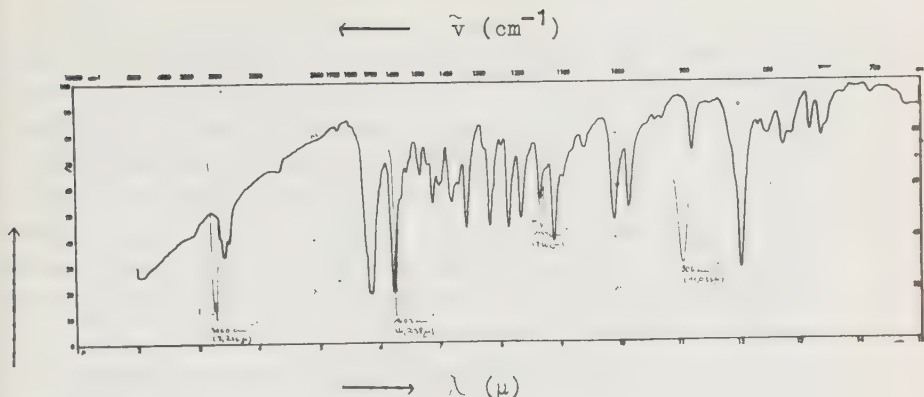


Abb. 14

IR-Spektrum von Umbelliprenin

2. Umbelliferon und Scopoletin

Da Umbelliferon und Scopoletin mit Benzol/Äthylacetat (9:1) nicht eluiert werden konnten, wurde die Säule trockengesaugt, ausgepreßt und die am Start verbliebene Zone durch 3malige Extraktion mit je 100 ml heißem Methanol herausgelöst. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels verblieben etwa 1 g eines hellgelben viskösen Sirups. Dieser wurde erneut am Aluminiumoxyd Woelm neutral chromatographiert (Säulenhöhe 50 cm, Durchmesser 3 cm). Nach Elution mit Methanol erhielten wir eine im UV-Licht dunkelblau fluoreszierende Lösung, die nach Einengen im Vakuum einen gelblich-weiß gefärbten Rückstand hinterließ. Dieser konnte durch einfache Vakuumsublimation gereinigt werden. Ausbeute 0.038 g. Schmelzpunkt 229° (Kofler unkor.); Literatur: Smp. 228 - 230° .

UV-Maxima: Max.I = 211 μ ($\log \epsilon = 4.129$)

Max.II = 325 μ ($\log \epsilon = 4.137$)

Umbelliferon $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3$	(162.15)	Ber. C	66.66	H	3.73
		Gef. C	66.51	H	3.92

Nach vollständiger Elution des Umbelliferons setzten wir die Entwicklung der Säule mit einer Methanol/Wassermischung (1:1) fort. Wir sammelten 14 Fraktionen à 30 ml. Die Fraktionen 1 - 8, die nach dünnschichtchromatographischer Prüfung neben Scopoletin weitere, unbekannte fluoreszierende Verbindungen enthielten, wurden verworfen. Die Fraktionen 9 - 14 bestanden aus einer chromatographisch reinen Scopoletinlösung. Die vereinigten Eluate wurden im Vakuum eingengt und der Rückstand einer Sublimation unter vermindertem Druck unterworfen. Ausbeute 4 mg.

Schmelzpunkt 205° (Kofler unkor.); Literatur: Smp. $204 - 205^{\circ}$. Der Mischschmelzpunkt (Smp. 205°) mit authentischem Scopoletin zeigte keine Depression.

VII. Quantitative Bestimmung von Gentianaceenbitterstoffen

Reagenzlösung: 200 mg Anthron p.a. werden in 100 ml Schwefelsäure p.a. (d 1.84) gelöst. Vor Verwendung muß die Reagenzlösung mindestens 2 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt werden. Sie ist bei Kühlschranktemperatur 24 Stunden haltbar.

Standardlösungen: Je 10 mg Glucose, Gentiobiose, Gentiopikrin, Amarogentin und Loganin werden in Wasser gelöst und in einem 100 ml Meßkolben zur Marke aufgefüllt.

a) Aufstellen der Eichkurven ohne vorherige chromatographische Trennung der Bitterstoffe

1 - 5 μ g entsprechende Mengen der Standardlösungen wurden in Reagenzgläser abpipettiert und mit Wasser auf 4 ml ergänzt. Dann ließen wir unter Eiskühlung langsam 10 ml Reagenzlösung aus einer Bürette zutropfen, schüttelten gut durch, erwärmten genau 5 Minuten im siedenden Wasserbad und kühlten die Lösungen anschließend sofort im Eisbad ab. Nach Anpassung an die Raumtemperatur wurde die Intensität der entstandenen Färbung in 1 cm Glasküvetten bei 620 m μ gegen einen Blindansatz, der anstelle der Bitterstofflösung ein gleiches Volumen Wasser enthielt, im Zeiss-Spektrophotometer PMQ 4 gemessen. Wir erhielten folgende Meßwerte:

T a b e l l e 20

Substanz	Extinktion			
	1 µg	2 µg	3 µg	4 µg
Glucose	0.368	0.74	1.16	1.51
	0.384	0.75	1.20	1.51
	0.376	0.74	1.14	1.50
	0.364	0.77	1.13	1.55
	0.362	0.76	1.14	1.52
	0.373	0.73	1.17	1.50
	0.375	0.73	1.13	1.51
	0.364	0.76	1.12	1.54
	0.368	0.76	1.12	1.50
	0.366	0.75	1.11	1.56
Gentiobiose	0.375	0.75	1.18	1.50
	0.384	0.76	1.15	1.51
	0.379	0.76	1.17	1.51
	0.378	0.76	1.18	1.54
	0.381	0.75	1.18	1.51
	0.379	0.76	1.17	1.50
Gentiopikrin	0.187	0.358	0.524	0.70
	0.165	0.362	0.562	0.71
	0.176	0.348	0.530	0.74
	0.183	0.367	0.517	0.71
	0.172	0.371	0.528	0.72
	0.191	0.346	0.521	0.73
	0.178	0.359	0.556	0.71
	0.169	0.364	0.547	0.75
	0.186	0.359	0.532	0.71
Amarogentin	0.074	0.178	0.287	0.363
	0.081	0.179	0.280	0.374
	0.076	0.193	0.296	0.359
	0.097	0.176	0.271	0.389
	0.108	0.206	0.245	0.375
	0.079	0.201	0.284	0.375
	0.116	0.197	0.304	0.384
	0.104	0.183	0.278	0.365
	0.092	0.185	0.267	0.361
	0.095	0.175	0.287	0.378
Loganin	0.161	0.304	0.525	0.659
	0.142	0.330	0.494	0.664
	0.126	0.344	0.518	0.671
	0.145	0.325	0.514	0.658
	0.175	0.329	0.513	0.675
	0.159	0.338	0.492	0.666
	0.153	0.333	0.498	0.682
	0.149	0.326	0.501	0.659
	0.158	0.309	0.499	0.665
	0.159	0.334	0.508	0.662

b) Aufstellen der Eichkurven nach Dünnschichtchromatographie der Bitterstoffe

Zur Aufstellung der Meßkurven brachten wir die unter a) verwendeten Mengen an Bitterstoffstandardlösung auf Kieselgel-G-Schichten auf und entwickelten Loganin im System Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5), Gentiopikrin im System wassergesättigtes n-Butanol, Amarogentin im System wassergesättigtes Äthylacetat und Glucose bzw. Gentiobiose im System Aceton/Butanol/Wasser (5:4:1) bis zu einer Höhe von 15 cm. Nach dem Abdunsten des Lösungsmittels wurde ein Parallelstreifen mit dem entsprechenden Sprühreagenz behandelt und die Bitterstoffzone auf dem unbesprühten Teil des Chromatogramms markiert. Die Lage der einzelnen Bitterstoffe geht aus Abb. 15 hervor.

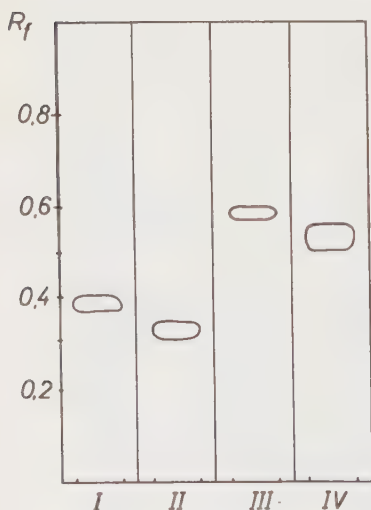


Abb. 15

Lage der Bitterstoffe auf dem Chromatogramm

- I = Gentiopikrin
Fließmittelsystem: Wassergesättigtes n-Butanol
- II = Amarogentin
Fließmittelsystem: Wassergesättigtes Äthylacetat
- III = Gentiobiose
Fließmittelsystem: Aceton/Butanol/Wasser (5:4:1)
- IV = Loganin
Fließmittelsystem: Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5)

Die bitterstoffhaltige Kieselgelschicht wurde abgelöst, in ein Reagenzglas überführt und wie bei der Aufstellung der Eichkurven (s.S.80) behandelt. Die durch Umsetzung der bitterstoffhaltigen Kieselgelschicht erhaltenen Farblösungen wurden gegen eine Blindlösung, die eine entsprechende Menge reines Kieselgel enthielt, gemessen. Wir erhielten folgende, in Tabelle 21 zusammengestellten Werte.

T a b e l l e 21

Substanz	1 µg	2 µg	3 µg	4 µg
Gentiobiose	0.372	0.760	1.15	1.50
	0.371	0.758	1.16	1.51
	0.374	0.758	1.13	1.55
	0.372	0.761	1.14	1.48
	0.371	0.763	1.16	1.50
Glucose	0.371	0.758	1.15	1.50
	0.371	0.761	1.14	1.52
	0.372	0.763	1.14	1.50
	0.372	0.759	1.14	1.50
	0.371	0.761	1.13	1.51
Loganin	0.156	0.315	0.500	0.658
	0.153	0.308	0.498	0.667
	0.149	0.325	0.514	0.656
	0.164	0.310	0.494	0.649
	0.160	0.318	0.493	0.661
Gentiopikrin	0.170	0.350	0.490	0.650
	0.165	0.361	0.484	0.639
	0.181	0.346	0.495	0.658
	0.168	0.341	0.498	0.654
	0.172	0.352	0.485	0.648
Amarogentin	0.086	0.167	0.255	0.330
	0.068	0.175	0.271	0.318
	0.097	0.183	0.245	0.338
	0.089	0.164	0.264	0.341
	0.079	0.185	0.252	0.325

c) Bestimmung des Bitterstoffgehalts in Pflanzenextrakten

Aus den grob gepulverten Drogen von Radix Gentianae, Herba Centaurii und Folia Trifolii Fibrini wurden nach Vorschrift des DAB 6 (s.S.65) Tinkturen zubereitet. 50 ml dieser Auszüge wurden im Vakuum vom Lösungsmittel befreit, der Rückstand in 30 ml Wasser aufgenommen, zur Entfernung des Chlorophylls und einiger Farbstoffe einmal mit dem gleichen Volumen Chloroform ausgeschüttelt und die gereinigte Lösung in einem 50 ml Meßkolben mit Wasser zur Marke aufgefüllt. Von diesen Stammlösungen trugen wir zur Bestimmung von Loganin und Gentiopikrin je 0.1 ml, von Gentiobiose 0.01 ml auf Standardkieselgelschichten auf. Zur Amarogentinbestimmung verwendeten wir 0.1 ml der auf 1/10 ihres Volumens konzentrierten Lösungen. Die Kieselgelschichten wurden in den genannten Systemen entwickelt, nach dem Trocknen ein Parallelstreifen mit dem entsprechenden Sprühreagenz behandelt, die Bitterstoffzone markiert, abgelöst und wie oben zur Umsetzung verwendet. Die Farbintensität der erhaltenen Lösungen wurde gegen eine unter gleichen Bedingungen hergestellte Blindlösung gemessen. Es ergaben sich folgende Werte.

1. Gentiopikrin in Radix Gentianae

10 g/50 ml / davon 0.1 ml

Mittlerer Extinktionswert aus 8 Versuchen: 0.635

$0.635 = 3.5 \mu\text{g}$

17.5 mg - 5 ml - 1 g Droge

1.75 g / 100 g Droge Trockengewicht

2. Amarogentin in Radix Gentianae

10 g/50 ml / Einengen auf 5 ml / davon 0.1 ml

Mittlerer Extinktionswert aus 8 Versuchen: 0.129

$0.129 = 1.3 \mu\text{g}$

6.5 μg - 5 ml - 1 g Droge

65 mg / 100 g Droge Trockengewicht

3. Gentiobiose in Radix Gentianae

10 g/50 ml / davon 0.01 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 5 Versuchen: 0.498
0.498 = 1.3 µg
65 mg - 5 ml - 1 g Droge
6.5 g / 100 g Droge Trockengewicht

4. Gentiopikrin in Herba Centaurii

10 g/50 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 8 Versuchen: 0.182
0.182 = 1.1 µg
5.5 mg - 5 ml - 1 g Droge
550 mg / 100 g Droge Trockengewicht

5. Loganin in Folia Trifolii Fibrini

10 g/50 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 7 Versuchen: 0.198
0.198 = 1.2 µg
6 mg - 5 ml - 1 g Droge
600 mg / 100 g Droge Trockengewicht

III. Vergleichende Untersuchungen über den Bitterstoffgehalt verschiedener Enzianwurzeln

Zur Bestimmung des Bitterstoffgehalts wurden die nach Vorschrift des DAB 6 (s.S. 65) bereiteten 20%igen Auszüge herangezogen. 50 ml dieser Lösungen wurden im Vakuum vom Lösungsmittel befreit, einmal mit dem gleichen Volumen Chloroform ausgeschüttelt und in einem 50 ml Meßkolben mit Wasser zur Marke aufgefüllt. Zur Bestimmung von Gentiobiose wurde 0.01 ml von Gentiopikrin 0.1 ml dieser Lösung auf Kieselgelschichten chromatographiert. Zur Amarogentinbestimmung verwendeten wir 0.1 ml der auf 1/10 ihres Volumens konzentrierten Stammlösung. Die einzelnen Chromatogramme wurden bis zu einer Höhe von 15 cm entwickelt, die Bitterstoffzonen wie auf Seite 80 beschrieben zur Umsetzung verwendet und die erhaltenen Farblösungen bei 620 mµ spektrophotometriert.

a) Bestimmung des Bitterstoffgehalts in Wurzeln verschiedener Enzianarten

Wir erhielten folgendes Ergebnis:

1. Gentiana lutea L.

Amarogentinbestimmung:

10 g/50 ml / Einengen auf 5 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.148
 $0.148 = 1.55 \mu\text{g}$
 $7.75 \mu\text{g} - 5 \text{ ml} - 1 \text{ g Droge}$
 $77.5 \text{ mg} / 100 \text{ g Droge Trockengewicht}$

Gentiopikrinbestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.750
 $0.750 = 4.26 \mu\text{g}$
 $21.3 \text{ mg} - 5 \text{ ml} - 1 \text{ g Droge}$
 $2.13 \text{ g} / 100 \text{ g Droge Trockengewicht}$

Gentiobiosebestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.01 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.498
 $0.498 = 1.3 \mu\text{g}$
 $65 \text{ mg} - 5 \text{ ml} - 1 \text{ g Droge}$
 $6.5 \text{ g} / 100 \text{ g Droge Trockengewicht}$

2. Gentiana pannonica L.

Amarogentinbestimmung:

10 g/50 ml / Einengen auf 5 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.158
 $0.158 = 1.7 \mu\text{g}$
 $8.5 \mu\text{g} - 5 \text{ ml} - 1 \text{ g Droge}$
 $85 \text{ mg} / 100 \text{ g Droge Trockengewicht}$

Gentiopikrinbestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.817
 $0.817 = 4.54 \mu\text{g}$
 $22.7 \text{ mg} - 5 \text{ ml} - 1 \text{ g Droge}$
 $2.27 \text{ g} / 100 \text{ g Droge Trockengewicht}$

Gentiobiosebestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.01 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.498
 $0.498 = 1.3 \mu\text{g}$
 $65 \text{ mg} - 5 \text{ ml} - 1 \text{ g Droge}$
 $6.5 \text{ g} / 100 \text{ g Droge Trockengewicht}$

3. Gentiana purpurea L.

Amarogentinbestimmung:

10 g/50 ml / Einengen auf 5 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.213
 $0.213 = 2.32 \mu\text{g}$
1.16 mg - 5 ml - 1 g Droge
116 mg / 100 g Droge Trockengewicht

Gentiopikrinbestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen/ 0.978
 $0.978 = 5.44 \mu\text{g}$
27.2 mg - 5 ml - 1 g Droge
2.72 g / 100 g Droge Trockengewicht

Gentiobiobiosebestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.01 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.410
 $0.410 = 1.1 \mu\text{g}$
55 mg - 5 ml - 1 g Droge
5.5 g / 100 g Droge Trockengewicht

4. Gentiana punctata L.

Amarogentinbestimmung:

10 g/50 ml / Einengen auf 5 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.231
 $0.231 = 2.5 \mu\text{g}$
1.25 mg - 5 ml - 1 g Droge
125 mg / 100 g Droge Trockengewicht

Gentiopikrinbestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.278
 $0.278 = 1.6 \mu\text{g}$
8 mg - 5 ml - 1 g Droge
800 mg / 100 g Droge Trockengewicht

Gentiobiobiosebestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.01 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.168
 $0.168 = 0.46 \mu\text{g}$
23 mg - 5 ml - 1 g Droge
2.3 g / 100 g Droge Trockengewicht

5. Gentiana asclepiadea L.

Amarogentinbestimmung:

10 g/50 ml / Einengen auf 5 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.147
 $0.147 = 1.58 \mu\text{g}$
7.4 μg - 5 ml - 1 g Droge
74 mg / 100 g Droge Trockengewicht

Gentiopikrinbestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.835
 $0.835 = 4.64 \mu\text{g}$
23.2 mg - 5 ml - 1 g Droge
2.32 g / 100 g Droge Trockengewicht

Gentiobiosebestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.01 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.260
 $0.260 = 0.7 \mu\text{g}$
35 mg - 5 ml - 1 g Droge
3.5 g / 100 g Droge Trockengewicht

b) Bestimmung des Bitterstoffgehalts nach Gefriertrocknung
des Drogenmaterials

Wir erhielten folgendes Ergebnis:

1. Gentiana lutea L.

Amarogentinbestimmung:

10 g/50 ml / Einengen auf 5 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert nach 6 Versuchen: 0.158
 $0.158 = 1.72 \mu\text{g}$
8.6 μg - 5 ml - 1 g Droge
86 mg / 100 g Droge Trockengewicht

Gentiopikrinbestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert nach 6 Versuchen: 0.935
 $0.935 = 5.2 \mu\text{g}$
26 mg - 5 ml - 1 g Droge
2.6 g / 100 g Droge Trockengewicht

Gentiobiosebestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.01 ml
Mittlerer Extinktionswert nach 6 Versuchen: 0.578
 $0.578 = 1.54 \mu\text{g}$
77 mg - 5 ml - 1 g Droge
7.7 g / 100 g Droge Trockengewicht

2. Gentiana pannonica L.

Amarogentinbestimmung:

10 g/50 ml / Einengen auf 5 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert nach 6 Versuchen: 0.160
 $0.160 = 1.74 \mu\text{g}$
8.7 μg - 5 ml - 1 g Droge
87 mg / 100 g Droge Trockengewicht

Gentiopikrinbestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.985
 $0.985 = 5.5 \mu\text{g}$
27.5 mg - 5 ml - 1 g Droge
2.75 g / 100 g Droge Trockengewicht

Gentiobiosebestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.01 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.598
 $0.598 = 1.6 \mu\text{g}$
80 mg - 5 ml - 1 g Droge
8.0 g / 100 g Droge Trockengewicht

3. Gentiana purpurea L.

Amarogentinbestimmung:

10 g/50 ml / Einengen auf 5 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.213
 $0.213 = 2.32 \mu\text{g}$
1.16 mg - 5 ml - 1 g Droge
116 mg / 100 g Droge Trockengewicht

Gentiopikrinbestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.985
 $0.985 = 5.5 \mu\text{g}$
27.5 mg - 5 ml - 1 g Droge
2.75 g / 100 g Droge Trockengewicht

Gentiobiosebestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.01 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.410
 $0.410 = 1.1 \mu\text{g}$
55 mg - 5 ml - 1 g Droge
5.5 g / 100 g Droge Trockengewicht

4. Gentiana asclepiadea L.

Amarogentinbestimmung:

10 g/50 ml / Einengen auf 5 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.153
 $0.153 = 1.64 \mu\text{g}$
8.2 μg - 5 ml - 1 g Droge
82 mg / 100 g Droge Trockengewicht

Gentiopikrinbestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.930
 $0.930 = 5.22 \mu\text{g}$
26.1 mg - 5 ml - 1 g Droge
2.61 g / 100 g Droge Trockengewicht

Gentiobiobestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.01 ml
Mittlerer Extinktionswert nach 6 Versuchen: 0.370
 $0.370 = 1.0 \mu\text{g}$
50 mg - 5 ml - 1 g Droge
5.0 g / 100 g Droge Trockengewicht

c) Bestimmung des Bitterstoffgehalts nach unterschiedlicher Lagerungsdauer des Drogenmaterials

Wir erhielten folgendes Ergebnis:

1. Gentiana lutea L. (60 Jahre gelagert)

Amarogentinbestimmung:

10 g/50 ml / Einengen auf 5 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert nach 6 Versuchen: 0.262
 $0.262 = 2.96 \mu\text{g}$
1.48 mg - 5 ml - 1 g Droge
148 mg / 100 g Droge Trockengewicht

Gentiopikrinbestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.360
 $0.360 = 2.02 \mu\text{g}$
10.1 mg - 5 ml - 1 g Droge
1.01 g / 100 g Droge Trockengewicht

Gentiobiobestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.130
 $0.130 = 0.36 \mu\text{g}$
18 mg - 5 ml - 1 g Droge
1.8 g / 100 g Droge Trockengewicht

2. Gentiana purpurea L. (36 Jahre gelagert)

Amarogentinbestimmung:

10 g/50 ml / Einengen auf 5 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.282
 $0.282 = 3.08 \mu\text{g}$
1.54 mg - 5 ml - 1 g Droge
154 mg / 100 g Droge Trockengewicht

Gentiopikrinbestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.163
 $0.163 = 0.9 \mu\text{g}$
4.5 mg - 5 ml - 1 g Droge
450 mg / 100 g Droge Trockengewicht

Gentiobiosebestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.01 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.126
0.126 = 0.36 µg
18 mg - 5 ml - 1 g Droge
1.8 g / 100 g Droge Trockengewicht

3. Gentiana punctata L. (28 Jahre gelagert)

Amarogentinbestimmung:

10 g/50 ml / Einengen auf 5 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.231
0.231 = 2.5 µg
1.25 mg - 5 ml - 1 g Droge
125 mg / 100 g Droge Trockengewicht

Gentiopikrinbestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.278
0.278 = 1.6 µg
8 mg - 5 ml - 1 g Droge
800 mg / 100 g Droge Trockengewicht

Gentiobiosebestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.01 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.168
0.168 = 0.46 µg
23 mg - 5 ml - 1 g Droge
2.3 g / 100 g Droge Trockengewicht

d) Bestimmung des Bitterstoffglucosidgehalts nach unterschiedlicher Lagerungsdauer der Drogenauszüge

Wir erhielten folgendes Ergebnis:

1. Gentiana lutea L.

1a) Auszüge aus gefriergetrockneter Droge (6 Monate gelagert)

Amarogentinbestimmung:

10 g/50 ml / Einengen auf 5 ml /davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.161
0.161 = 1.76 µg
8.8 µg - 5 ml - 1 g Droge
88 mg / 100 g Droge Trockengewicht

Gentiopikrinbestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.816
0.816 = 4.54 µg
22.7 mg - 5 ml - 1 g Droge
2.27 g /100 g Droge Trockengewicht

1b) Auszüge aus luftgetrockneter Droge (6 Monate gelagert)

Amarogentinbestimmung:

10 g/50 ml / Einengen auf 5 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert nach 6 Versuchen: 0.149
 $0.149 = 1.62 \mu\text{g}$
 $8.1 \mu\text{g} - 5 \text{ ml} - 1 \text{ g Droge}$
81 mg / 100 g Droge Trockengewicht

Gentiopikrinbestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.744
 $0.744 = 4.16 \mu\text{g}$
 $20.7 \text{ mg} - 5 \text{ ml} - 1 \text{ g Droge}$
2.07 g / 100 g Droge Trockengewicht

2. Gentiana pannonica L.

2a) Auszüge aus gefriergetrockneter Droge (6 Monate gelagert)

Amarogentinbestimmung:

10 g/50 ml / Einengen auf 5 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.156
 $0.156 = 1.8 \mu\text{g}$
 $9.0 \mu\text{g} - 5 \text{ ml} - 1 \text{ g Droge}$
90 mg / 100 g Droge Trockengewicht

Gentiopikrinbestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.937
 $0.937 = 5.24 \mu\text{g}$
 $26.2 \text{ mg} - 5 \text{ ml} - 1 \text{ g Droge}$
2.62 g / 100 g Droge Trockengewicht

2b) Auszüge aus luftgetrockneter Droge (6 Monate gelagert)

Amarogentinbestimmung:

10 g/50 ml / Einengen auf 5 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.167
 $0.167 = 1.78 \mu\text{g}$
 $8.9 \mu\text{g} - 5 \text{ ml} - 1 \text{ g Droge}$
89 mg / 100 g Droge Trockengewicht

Gentiopikrinbestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.1 ml
Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.771
 $0.771 = 4.3 \mu\text{g}$
 $21.5 \text{ mg} - 5 \text{ ml} - 1 \text{ g Droge}$
2.15 g / 100 g Droge Trockengewicht

3. Gentiana asclepiadea L.

3a) Auszüge aus gefriergetrockneter Droge (6 Monate gelagert)

Amarogentinbestimmung:

10 g/50 ml / Einengen auf 5 ml / davon 0.1 ml

Mittlere Extinktion aus 6 Versuchen: 0.159

0.159 = 1.7 µg

8.5 µg - 5 ml - 1 g Droge

85 mg / 100 g Droge Trockengewicht

Gentiopikrinbestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.1 ml

Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.914

0.914 = 5.1 µg

25.5 mg - 5 ml - 1 g Droge

2.55 g / 100 g Droge Trockengewicht

3b) Auszüge aus luftgetrockneter Droge (6 Monate gelagert)

Amarogentinbestimmung:

10 g/50 ml / Einengen auf 5 ml / davon 0.1 ml

Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.161

0.161 = 1.78 µg

7.9 µg - 5 ml - 1 g Droge

79 mg / 100 g Droge Trockengewicht

Gentiopikrinbestimmung:

10 g/50 ml / davon 0.1 ml

Mittlerer Extinktionswert aus 6 Versuchen: 0.807

0.807 = 4.46 µg

22.3 mg - 5 ml - 1 g Droge

2.23 g / 100 g Droge Trockengewicht

IX. Physiologische Bitterwertsbestimmung nach WASICKY¹⁰⁸⁾

a) Bestimmung des Bitterwerts der Standardbrucinlösung

Die Eichung der Versuchspersonen erfolgte durch Bestimmung des Bitterwertes der Standardbrucinlösung.

Standardverdünnung: Wir lösten 0.01 g Brucin im Wägegglas in wenig Äthanol und füllten unter Nachspülen mit Trinkwasser in einem 5 l Meßkolben bis zur Marke auf (1:50 000).

Aus dieser Lösung stellten wir uns die Stammlösung her, indem wir 2 ml dieser Lösung mit Wasser auf 100 ml ver-

108) R.WASICKY, R.BARBIERI u. H.WEBER, Anais.fac.fam.odontol. Univ.Sao Paulo 2, 113 (1942-1943); ref.Chem.Abstr. 39, 5396 (1945)

dünnten (1:2 500 000). Von dieser Stammlösung pipettierten wir 4.9; 5.2; 5.5; 5.8; 6.1; 6.4; 6.7; 7.0 bzw. 7.3 ml ab und ergänzten mit Trinkwasser auf 10 ml.

Die so hergestellten Verdünnungen 1:5 100 00, 1:4 810 000, 1:4 530 000, 1:4 310 000, 1:3 910 000, 1:3 730 000, 1:3 570 000, 1:3 380 000 und 1:3 200 000 wurden zur Geschmacksprüfung herangezogen, indem die Versuchspersonen nach Spülen des Mundes mit Trinkwasser von Zimmertemperatur die Probelösung in den Mund nahmen und darin 1/2 Minute hin- und herbewegten, um alle Teile der Zunge gleichmäßig mit der Flüssigkeit in Berührung zu bringen, ausspuckten und mit Trinkwasser nachspülten, jedoch nur dann, wenn bereits ein bitterer Geschmack empfunden wurde. Andernfalls warteten wir mit dem Ausspülen etwa 1 Minute, da in der Nähe der Reizschwelle der bittere Geschmack oft erst verspürt wird, wenn unmittelbar nach dem Ausspucken Schluckbewegungen einsetzen. Wurde diese Konzentration noch nicht als bitter empfunden, prüften wir nach etwa 10 Minuten die Konzentration einer um 5% stärkeren Lösung in der gleichen Weise und setzten die Untersuchung der Reihe so lange fort, bis eine Konzentration als zweifelhaft, die nächsthöhere als bitter empfunden wurde. Die von den 12 Versuchspersonen als bitter bezeichneten Verdünnungen gehen aus Tabelle 22 hervor.

T a b e l l e 22

Verdünnung	1:5 100 000- 1:4 800 000	1:4 530 000	1:4 310 000	1:4 110 000	1:3 910 000
1. Versuchsperson	nicht bitter	nicht bitter	nicht bitter	nicht bitter	b i t t e r
2. Versuchsperson	nicht bitter	b i t t e r	ø	ø	ø
3. Versuchsperson	nicht bitter	nicht bitter	nicht bitter	nicht bitter	b i t t e r
4. Versuchsperson	nicht bitter	nicht bitter	nicht bitter	nicht bitter	b i t t e r
5. Versuchsperson	nicht bitter	nicht bitter	b i t t e r	ø	ø
6. Versuchsperson	nicht bitter	nicht bitter	b i t t e r	ø	ø
7. Versuchsperson	nicht bitter	nicht bitter	nicht bitter	b i t t e r	ø
8. Versuchsperson	nicht bitter	nicht bitter	nicht bitter	nicht bitter	b i t t e r
9. Versuchsperson	nicht bitter	nicht bitter	nicht bitter	b i t t e r	ø
10. Versuchsperson	nicht bitter	nicht bitter	b i t t e r	ø	ø
11. Versuchsperson	nicht bitter	nicht bitter	nicht bitter	nicht bitter	b i t t e r
12. Versuchsperson	nicht bitter	nicht bitter	nicht bitter	b i t t e r	ø

Zeichenerklärung: ø = die Verdünnung wurde von der betreffenden Versuchsperson nicht mehr getestet, da eine schwächer konzentrierte Lösung bereits als bitter empfunden wurde.

Als annähernder Mittelwert errechnet sich hieraus die den Bitterwertsbestimmungen der Norm zugrunde gelegte Brucinverdünnung von 1:4 200 000.

b) Bestimmung des Bitterwerts eines Enzianauszugs

Zur Herstellung der Standardenzianverdünnung füllten wir 5 ml Tinktur im 500 ml Meßkolben mit Wasser zur Marke auf und verdünnten 2 ml dieser Lösung mit Wasser auf 100 ml. Von dieser Stammlösung (1:25 000) pipettierten wir 4.9; 5.2; 5.5; 5.8 etc. ml ab und ergänzten mit Trinkwasser auf 10 ml. Die erhaltenen Verdünnungen 1:51 200; 1:48 100; 1:44 400, 1:40 900; 1:39 000; 1:37 300 und 1:35 700 wurden zur unmittelbaren Geschmacksprüfung herangezogen. Die von den 12 Versuchspersonen als bitter bezeichneten Verdünnungen gehen aus Tabelle 23 hervor.

T a b e l l e 23

Verdünnung	1:51 200- 1:40 900	1:39 000	1:37 300	1:35 700
1.Versuchsperson	nicht bitter	nicht bitter	nicht bitter	b i t t e r
2.Versuchsperson	nicht bitter	b i t t e r	ø	ø
3.Versuchsperson	nicht bitter	nicht bitter	nicht bitter	b i t t e r
4.Versuchsperson	nicht bitter	nicht bitter	nicht bitter	b i t t e r
5.Versuchsperson	nicht bitter	nicht bitter	b i t t e r	ø
6.Versuchsperson	nicht bitter	nicht bitter	b i t t e r	ø
7.Versuchsperson	nicht bitter	b i t t e r	ø	ø
8.Versuchsperson	nicht bitter	nicht bitter	nicht bitter	b i t t e r
9.Versuchsperson	nicht bitter	nicht bitter	nicht bitter	b i t t e r
10.Versuchsperson	nicht bitter	nicht bitter	nicht bitter	b i t t e r
11.Versuchsperson	nicht bitter	nicht bitter	nicht bitter	b i t t e r
12.Versuchsperson	nicht bitter	nicht bitter	b i t t e r	ø

Als annähernder Mittelwert errechnet sich daraus für den Enzianauszug ein Bitterwert von 1:37 000.

c) Bestimmung des Bitterwerts von Gentiobiose

Zur Festlegung des Bitterwerts der Gentiobiose lösten wir 100 mg Gentiobiose in 100 ml Wasser (1:1000), pipettierten 4.9; 5.2; 5.5 ml etc. dieser Lösung ab und ergänzten in Proberöhrchen mit Trinkwasser auf 10 ml. Mit den erhaltenen Verdünnungen 1:2040, 1:1920, 1:1840, 1:1720, 1:1630, 1:1560, 1:1490 und 1:1320 führten wir die Geschmacksprüfung durch. Die von den einzelnen Versuchspersonen als bitter bezeichneten Verdünnungen gehen aus Tabelle 24, Seite 98, hervor.

T a b e l l e 24

Verdünnung	1:2040-1:1720	1:1630	1:1560	1:1490	1:1320
1.Versuchsperson	nicht bitter	nicht bitter	nicht bitter	nicht bitter	b i t t e r
2.Versuchsperson	nicht bitter	b i t t e r	∅	∅	∅
3.Versuchsperson	nicht bitter	nicht bitter	b i t t e r	∅	∅
4.Versuchsperson	nicht bitter	nicht bitter	nicht, bitter	nicht bitter	b i t t e r
5.Versuchsperson	nicht bitter	nicht bitter	nicht bitter	b i t t e r	∅
6.Versuchsperson	nicht bitter	nicht bitter	nicht bitter	b i t t e r	∅
7.Versuchsperson	nicht bitter	nicht bitter	nicht bitter	b i t t e r	∅
8.Versuchsperson	nicht bitter	b i t t e r	∅	∅	∅

Als annähernder Mittelwert errechnet sich daraus für Gentiobiose ein Bitterwert von 1:1500.

L e b e n s l a u f

Am 16. März 1935 wurde ich, Hannelore H e l d , als Tochter des Kaufmanns Theodor Held und seiner Ehefrau Christine geb. Gutermuth in Frankfurt/Main geboren.

Nach 4jährigem Volksschulunterricht besuchte ich die Schiller-Schule, Realgymnasium für Mädchen, in Frankfurt/Main, an der ich im März 1955 das Abitur ablegte.

Die 2jährige Tätigkeit als Apothekerpraktikantin verbrachte ich in der Rathaus-Apotheke in Frankfurt/Main-Fechenheim. Im März 1957 bestand ich in Wiesbaden das pharmazeutische Vorexamen. Im Winter-Semester 1957/58 begann ich an der Johann Wolfgang v.Goethe-Universität in Frankfurt/Main das Pharmaziestudium, das ich im September 1960 mit dem pharmazeutischen Staatsexamen abschloß. Von Oktober 1960 bis April 1961 arbeitete ich in der Adler-Apotheke in Bernkastel-Cues. Die Bestallung als Apothekerin erhielt ich im Oktober 1961.

Die vorliegende Arbeit begann ich im Juli 1961 am Institut für pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München unter der Leitung von Herrn Professor Dr.L. Hörhammer. Sie wurde im Dezember 1963 abgeschlossen.

